

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003694

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-053361
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 14 April 2005 (14.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

25.02.2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 2月27日
Date of Application:

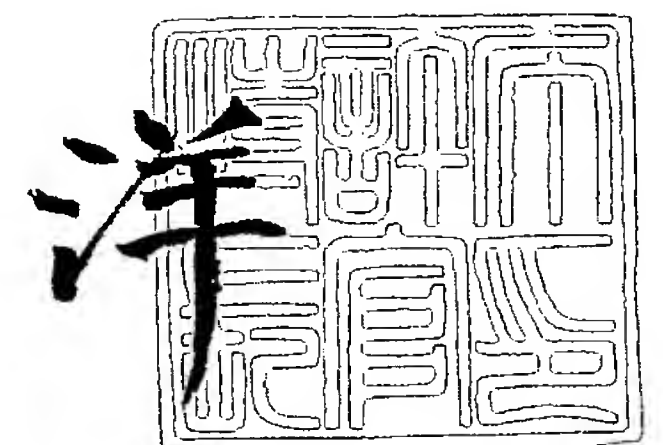
出願番号 特願2004-053361
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2004-053361]

出願人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

2005年 3月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 H16-0012T4
【提出日】 平成16年 2月27日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12P 13/00
【発明者】
 【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社 生産技術
 研究所内
 【氏名】 橋本 信一
【発明者】
 【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社 生産技術
 研究所内
 【氏名】 寺園 浩一
【発明者】
 【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社 生産技術
 研究所内
 【氏名】 安原 昭典
【発明者】
 【住所又は居所】 山口県山口市大字吉敷 2 6 4 5 - 2 7
 【氏名】 松下 一信
【特許出願人】
 【識別番号】 000001029
 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
 【代表者】 松田 譲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 008187
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入して得られる微生物を培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生成、蓄積させ、該培養物よりL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

【請求項 2】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属およびラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来のDNA、または該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであることを特徴とする、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae*)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、アゾトバクター・ビネランディ (*Azotobacter vinelandii*)、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) およびラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来のDNA、または該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであることを特徴とする、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 4】

コリネバクテリウム属に属する微生物由来のDNAが、配列番号 3 または 5 記載の塩基配列を有するDNAであり、エシェリヒア属に属する微生物由来のDNAが、配列番号 7 記載の塩基配列を有するDNAであり、シュードモナス属に属する微生物由来のDNAが、配列番号 9 記載の塩基配列を有するDNAであり、アゾトバクター属に属する微生物由来のDNAが、配列番号 11 記載の塩基配列を有するDNAであり、サルモネラ属に属する微生物由来のDNAが、配列番号 13 記載の塩基配列を有するDNAであり、ラクトバチルス属に属する微生物由来のDNAが、配列番号 15 記載の塩基配列を有するDNAである、請求項 2 記載の製造法。

【請求項 5】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh(FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhの有するエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAである、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 6】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼが、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 の製造法。

【請求項 7】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh(FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhの有するエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAにコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 の製造法。

【請求項 8】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入する微生物が、エシエリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、オーレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、クラビバクター (*Clavibacter*) 属、クルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、ピメロバクター (*Pimerobacter*) 属およびバチルス (*Bacillus*) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、請求項1～7いずれか1項記載の製造法。

【請求項9】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入する微生物が、エシエリヒア属に属する微生物である、請求項1～7いずれか1項記載の製造法。

【請求項10】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入する微生物が、エシエリヒア・コリに属する微生物である、請求項1～7いずれか1項記載の製造法。

【請求項11】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入する微生物が、コリネバクテリウム属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、請求項1～7いずれか1項記載の製造法。

【請求項12】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・フラバム (*Corynebacterium flavum*)、コリネバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Corynebacterium lactofermentum*) およびコリネバクテリウム・エフィカシス (*Corynebacterium efficiens*) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、請求項1～7いずれか1項記載の製造法。

【請求項13】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物である、請求項1～7いずれか1項記載の製造法。

【請求項14】

L-アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-リジン、L-アルギニン、L-シトルリン、L-スレオニン、L-メチオニン、L-バリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリンおよびL-ヒスチジンからなる群より選ばれるL-アミノ酸である、請求項1～13いずれか1項記載の製造法。

【請求項15】

L-アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミンおよびL-リジンからなる群より選ばれるアミノ酸である、請求項1～13いずれか1項記載の製造法。

【請求項16】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入して得られるコリネバクテリウム属に属する微生物。

【請求項17】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入して得られるコリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物。

【請求項18】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、コリネバクテリウム属、エシエリヒア属、シュードモナス属、アゾトバクター属、サルモネラ属およびラクトバチルス属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来のDNA、または該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAである、請求項16または17記載の微生物。

【請求項19】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・ジフテリア、エシェリヒア・コリ、シュードモナス・フルオレッセンス、アゾトバクター・ビネランディー、サルモネラ・ティフィムリウムおよびラクトバチルス・プランタラムに属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来のDNA、または該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAである、請求項16または17記載の微生物。

【請求項20】

コリネバクテリウム属に属する微生物由来のDNAが、配列番号3または5記載の塩基配列を有するDNAであり、エシェリヒア属に属する微生物由来のDNAが、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAであり、シュードモナス属に属する微生物由来のDNAが、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAであり、アゾトバクター属に属する微生物由来のDNAが、配列番号11記載の塩基配列を有するDNAであり、サルモネラ属に属する微生物由来のDNAが、配列番号13記載の塩基配列を有するDNAであり、ラクトバチルス属に属する微生物由来のDNAが、配列番号15記載の塩基配列を有するDNAである、請求項18記載の微生物。

【請求項21】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhの有するエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAである、請求項16または17記載の微生物。

【請求項22】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼが、配列番号4、6、8、10、12、14および16記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドである、請求項16または17記載の微生物。

【請求項23】

エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhの有するエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAによりコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする請求項16または17記載の微生物。

【請求項24】

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh、またはコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh。

【請求項25】

エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)。

【請求項26】

エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndh。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-アミノ酸の製造法

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、L-アミノ酸の製造法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

近年、微生物の電子伝達系に変異を施し、アミノ酸等の物質の生産性を向上させる試みが報告されている。

例えば、中井らは、エシェリヒア・コリのエネルギー産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを増幅させるか、またはエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを欠損させることでアミノ酸の生産性が向上することを報告している（特許文献1参照）。

【0 0 0 3】

また、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) において、エネルギー生成効率の高いチトクロムbcオキシダーゼをコードするDNAを増幅することによってリボフラビンの生産性が向上するとの報告がある（特許文献2参照）。

電子伝達系における変異が生育に及ぼす影響について、Molenaarらはコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) のNADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを破壊したが、生育等への影響はなかったことを報告している（非特許文献1参照）。

【0 0 0 4】

このように微生物の電子伝達系における変異が、該微生物による物質の生産性に影響を及ぼす可能性のあることが知られているが、どのように影響するかを予測することは難しい。

従来の方法に加えてさらに物質の生産性を向上させる方法の開発が望まれている。

【特許文献1】 特開2002-17363号公報

【特許文献2】 国際公開第03/072785号パンフレット

【非特許文献1】 Journal of Bacteriology, 2000年, 第182巻, p.6884-6891

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

本発明の目的は、工業的に有利なL-アミノ酸の製造法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

本発明は以下の(1)～(26)に関する。

(1) エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAを導入して得られる微生物を培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生成、蓄積させ、該培養物よりL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

(2) エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属およびラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来のDNA、または該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであることを特徴とする、上記(1)の製造法。

【0 0 0 7】

(3) エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAが、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ジフテリウム (*Corynebacterium diphtheriae*)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、アゾトバクター・ビネラ

ンデイー (*Azotobacter vinelandii*)、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) およびラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であることを特徴とする、上記 (1) の製造法。

(4) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 3 または 5 記載の塩基配列を有する DNA であり、エシェリヒア属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 7 記載の塩基配列を有する DNA であり、シュードモナス属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 9 記載の塩基配列を有する DNA であり、アゾトバクター属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 11 記載の塩基配列を有する DNA であり、サルモネラ属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 13 記載の塩基配列を有する DNA であり、ラクトバチルス属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 15 記載の塩基配列を有する DNA である、上記 (2) の製造法。

【0008】

(5) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA または該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA である、上記 (1) の製造法。

(6) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする上記 (1) の製造法。

【0009】

(7) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA にコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする上記 (1) の製造法。

(8) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、オーレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、クラビバクター (*Clavibacter*) 属、クルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、ピメロバクター (*Pimerobacter*) 属およびバチルス (*Bacillus*) 属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

【0010】

(9) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(10) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、エシェリヒア・コリに属する微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(11) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、上記

(1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

【0011】

(12) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバク

テリウム・フラバム (*Corynebacterium flavum*)、コリネバクテリウム・ラクトファーマンタム (*Corynebacterium lactofermentum*) およびコリネバクテリウム・エフィカシス (*Corynebacterium efficiens*) に属する微生物からなる群より選ばれる微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

(13) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物である、上記 (1) ~ (7) いずれか 1 つの製造法。

【0012】

(14) L-アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-リジン、L-アルギニン、L-シトルリン、L-スレオニン、L-メチオニン、L-バリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリンおよび L-ヒスチジンからなる群より選ばれる L-アミノ酸である、上記 (1) ~ (13) いずれか 1 つの製造法。

(15) L-アミノ酸が、L-グルタミン酸、L-グルタミンおよび L-リジンからなる群より選ばれるアミノ酸である、上記 (1) ~ (13) いずれか 1 つの製造法。

【0013】

(16) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られるコリネバクテリウムに属する微生物。

(17) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られるコリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物。

(18) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム属、エシェリヒア属、シュードモナス属、アゾトバクター属、サルモネラ属およびラクトバチルス属に属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA である、上記 (16) または (17) の微生物。

【0014】

(19) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・ジフテリア、エシェリヒア・コリ、シュードモナス・フルオレッセンス、アゾトバクター・ビネランディイ、サルモネラ・ティフィムリウムおよびラクトバチルス・プラントラムに属する微生物からなる群より選ばれる微生物由来の DNA、または該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA である、上記 (16) または (17) の微生物。

(20) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 3 または 5 記載の塩基配列を有する DNA であり、エシェリヒア属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 7 記載の塩基配列を有する DNA であり、シュードモナス属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 9 記載の塩基配列を有する DNA であり、アゾトバクター属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 11 記載の塩基配列を有する DNA であり、サルモネラ属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 13 記載の塩基配列を有する DNA であり、ラクトバチルス属に属する微生物由来の DNA が、配列番号 15 記載の塩基配列を有する DNA である、上記 (18) の微生物。

【0015】

(21) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA が、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh の有するエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA または該 DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA である、上記 (16) または (17) の微生物。

(22) エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼが、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 記載のアミノ酸配列からなる群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型 NADH デヒ

ドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドである、上記(16)または(17)の微生物。

【0016】

(23) エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼが、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh(FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhの有するエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAによりコードされるポリペプチド、または該ポリペプチドの有するアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドであることを特徴とする上記(16)または(17)の微生物。

(24) コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh、またはコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh。

【0017】

(25) エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)。

(26) エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndh。

【発明の効果】

【0018】

本発明により、工業的に有利な、L-アミノ酸の製造法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明に用いられるエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ(以下、NDHポリペプチドともいう)は、好気性細菌の電子伝達系においてプロトンポンプとして作用するNADHデヒドロゲナーゼ複合体のうち、電子1個あたり排出できるプロトン分子数がゼロであるNADHデヒドロゲナーゼ複合体を構成するNADHデヒドロゲナーゼの活性(以下、エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性と略す)を有するポリペプチドであれば、いずれのポリペプチドであってもよい。

【0020】

NDHポリペプチドとしては、例えば、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、エシェリヒア(Escherichia)属、シュードモナス属(Pseudomonas)属、アゾトバクター(Azotobacter)属、サルモネラ(Salmonella)属、ラクトバチルス(Lactobacillus)属に属する微生物等に由来する公知のNDHポリペプチドをあげることができる。

コリネバクテリウム属に属する微生物としては、コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)、コリネバクテリウム・ジフテリア(Corynebacterium diphtheriae)に属する微生物等をあげることができる。

【0021】

エシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)に属する微生物等をあげることができる。

シュードモナス属に属する微生物としては、シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)に属する微生物等をあげることができる。

アゾトバクター属に属する微生物としては、アゾトバクター・ビネランディー(Azotobacter vinelandii)に属する微生物をあげることができる。

【0022】

サルモネラ属に属する微生物としては、サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)に属する微生物をあげることができる。

ラクトバチルス属に属する微生物としては、ラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum)に属する微生物をあげることができる。

これらの微生物に由来する、公知のNDHポリペプチドとしては、例えば、コリネバクテリウム属に属する微生物に由来する配列番号4または6記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、エシェリヒア属に属する微生物に由来する配列番号8記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、シュードモナス属に属する微生物に由来する配列番号10記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、アゾトバクター属に属する微生物に由来する配列番号

12 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、サルモネラ属に属する微生物に由来する配列番号 14 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、ラクトバチルス属に属する微生物に由来する配列番号 16 記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをあげることができる。

【0023】

また、エシェリヒア・コリ DH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633) の保有するプラスミド pCS-CGndh が有する、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のエネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA (ndh) によりコードされるポリペプチド (以下、NDH ポリペプチド A と略す) も NDH ポリペプチドとしてあげることができる。

さらに、本発明に用いられる NDH ポリペプチドは、エネルギー非産生型 NADH デヒドロゲナーゼ活性を有していれば、NDH ポリペプチド A または公知の NDH ポリペプチドの有するアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであってもよい。

【0024】

NDH ポリペプチド A または公知の NDH ポリペプチドの有するアミノ酸配列に 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (以下、モレキュラー・クローニング第 3 版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) 等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、NDH ポリペプチド A または公知の NDH ポリペプチドをコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

【0025】

欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1 個から数十個、好ましくは 1 ~ 20 個、より好ましくは 1 ~ 10 個、さらに好ましくは 1 ~ 5 個である。

NDH ポリペプチド A または公知の NDH ポリペプチドの有するアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたとは、同一配列中の任意かつ 1 もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1 または複数のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加があることを意味し、欠失、置換若しくは付加が同時に生じてよい。

【0026】

置換若しくは付加されるアミノ酸は天然型と非天然型とを問わない。

天然型アミノ酸としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

【0027】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

A 群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B 群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C 群：アスパラギン、グルタミン

D群: リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群: プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群: セリン、スレオニン、ホモセリン

G群: フェニルアラニン、チロシン

また、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドに1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドが、エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するためには、欠失、置換若しくは付加前のポリペプチドと、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

【0028】

アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5873(1993)]やFASTA[*Methods Enzymol.*, **183**, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている[*J. Mol. Biol.*, **215**, 403(1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

【0029】

NDHポリペプチドのエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼの活性は、たとえば*FEBS Microbiology Letters*, **204**, 271 (2001)の記載に準じて、エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ、ユビキノーン1およびNADHを含有する反応液における275nmまたは340nmでの吸光度の減少を測定することにより測定することができる。

NDHポリペプチドをコードするDNAとしては、エネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAであれば、いずれのDNAであってもよい。

【0030】

NDHポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAをあげることができる。

例えば、NDHポリペプチドAをコードする、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhが有する、コリネバクテリウム・グルタミカム由来のNADHデヒドロゲナーゼをコードするDNA、配列番号4、6、8、10、12、14および16記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをそれぞれコードする、配列番号3、5、7、9、11、13および15記載の塩基配列を有するDNA等をあげるすることができる。

【0031】

また、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAも、NDHポリペプチドをコードするDNAとしてあげるすることができる。

NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAの一部、または全部をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0mol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/l塩化ナトリウム、15mmol

/1クエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0032】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、上記BLASTやFASTA等を用いて計算したときに、NDHポリペプチドAまたは公知のNDHポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と75%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0033】

NDHポリペプチドをコードするDNAは、好気性細菌であって、電子伝達系にエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼを有する微生物から下記の方法に準じて調製することができる。電子伝達系にエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼを有する微生物としては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 等のコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、オーレオバクテリウム (*Aureobacterium*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、クラビバクター (*Clavibacter*) 属、クルトバクテリウム (*Curtobacterium*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、ピメロバクター (*Pimerobacter*) 属に属する微生物等のいわゆるコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する微生物、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 等のシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物、アゾトバクター・ビネランディー (*Azotobacter vinelandii*) 等のアゾトバクター (*Azotobacter*) 属に属する微生物、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 等のサルモネラ (*Salmonella*) 属に属する微生物、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 等のラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属に属する微生物等をあげることができる。

【0034】

上記微生物を公知の方法[例えば、Mol. Microbiol., 20, 833 (1996)に記載の方法]により培養し、培養後、公知の方法(例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法)により、該微生物の染色体DNAを単離精製する。

単離精製した染色体DNAを用いて、モレキュラー・クローニング第3版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法に準じてDNAライブラリーを作製する。

【0035】

DNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、エシェリヒア・コリK12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、λ zap II (ストラタジーン社製)、λ gt10、λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λ TriplEx (クローンテック社製)、λ ExCell (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pBluescript II KS(-)、pBluescript II SK(+) [ストラタジーン社製、Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]等をあげることができる。

【0036】

DNAを組み込んだベクターをエシェリヒア・コリに属する微生物に導入する。

エシェリヒア・コリに属する微生物としては、エシェリヒア・コリに属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、エシェリヒア・コリXL1-Blue MRF' [

ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、エシェリヒア・コリ C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、エシェリヒア・コリ Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、エシェリヒア・コリ Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、エシェリヒア・コリ NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、エシェリヒア・コリ K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、エシェリヒア・コリ JM109 [Gene, 38, 275 (1985)]、エシェリヒア・コリ DH5 α [J. Mol. Biol., 166, 557 (1983)]等をあげることができる。

【0037】

モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等の実験書に記載されているコロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等により、得られたDNAライブラリーから目的とするクローンを取得することができる。

【0038】

ハイブリダイゼーションに用いるDNAプローブとしては、公知のNDHポリペプチドをコードするDNAまたはその一部、該DNAの塩基配列をもとに合成したDNAなどの他、公知の塩基配列を利用して設計したDNAプライマーを用いてPCRなどにより取得したDNA断片などをあげることができる。例えば、配列番号3記載の塩基配列を有する、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物のndhの塩基配列をもとに設計した配列番号1および2記載の塩基配列を有するDNAを、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成し、該合成DNAをプライマーとして、コリネバクテリウム・グルタミカムに属する微生物から取得したDNA断片などを例示することができる。

【0039】

取得したDNAをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断後、常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばABI377DNAシーケンサー（パーキン・エルマー社製）等を用いたジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]により、該DNAの塩基配列を決定する。

さらに、決定された塩基配列に基づいたプライマーを調製し、染色体DNAを鋳型として、PCR法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)]により、目的とするDNAを取得することができる。

【0040】

また、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。

上記のようにして取得される本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、エシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhが有するエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼをコードするDNAをあげることができる。該DNAは、NDHポリペプチドAをコードするDNAである。

【0041】

得られた本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAを宿主微生物に導入することにより、本発明のアミノ酸の製造法に用いられる微生物を作製することができる。

本発明に用いられるポリペプチドコードするDNAを宿主微生物に導入する方法としては、該DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入して組換え体DNAを作製し、該組換え体DNAを宿主微生物に導入する方法をあげることができる。

【0042】

宿主微生物は、好気性細菌であれば特に限定されない。また、該微生物の電子伝達系は、特にエネルギー非産生型NADHデヒドロゲナーゼを用いるものでなくてもよい。

宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、アースロバクター

(Arthrobacter) 属、オーレオバクテリウム (Aureobacterium) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、クラビバクター (Clavibacter) 属、クルトバクテリウム (Curtobacterium) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ピメロバクター (Pimerobacter) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラチア (Serratia) 属、エルビニア (Erwinia) 属、バチルス (Bacillus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アナベナ (Anabaena) 属、クロマチウム (Chromatium) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、ロドスピリウム (Rhodospirillum) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、ザイモモナス (Zymomonas) 属等に属する微生物があげられる。

【0043】

エシェリヒア属に属する微生物としては、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522等のエシェリヒア・コリに属する微生物をあげることができる。

【0044】

コリネバクテリウム属に属する微生物としては、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC13869等のCorynebacterium glutamicum、Corynebacterium ammoniagenes ATCC6872、Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170等のCorynebacterium ammoniagenes、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870等のCorynebacterium acetoacidophilumに属する微生物等をあげることができる。

【0045】

ブレビバクテリウム属に属する微生物としては、Brevibacterium immariophilum、Brevibacterium saccharolyticum、Brevibacterium flavum、Brevibacterium lactofermentumに属する微生物等をあげることができる。

アースロバクター属に属する微生物としては、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformisに属する微生物等をあげることができる。

【0046】

オーレオバクテリウム属に属する微生物としては、Aureobacterium flavescens、Aureobacterium anophagephaga、Aureobacterium testaceumに属する微生物等をあげることができる。

セルロモナス属に属する微生物としては、Cellulomonas flavigena、Cellulomonas caribaeaに属する微生物等をあげることができる。

【0047】

クラビバクター属に属する微生物としては、Clavibacter michiganensis、Clavibacter rathayiに属する微生物等をあげることができる。

クルトバクテリウム属に属する微生物としては、Curtobacterium albidum、Curtobacterium citreum、Curtobacterium luteumに属する微生物等をあげることができる。

ミクロバクテリウム属に属する微生物としては、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354等のMicrobacterium ammoniaphilum、Microbacterium lacticum、Microbacterium imperialeに属する微生物等をあげることができる。

【0048】

ピメロバクター属に属する微生物としては、Pimerobacter simplexに属する微生物等をあげることができる。

エンテロバクター属に属する微生物としては、Enterobacter agglomerans ATCC1228等のEnterobacter agglomerans、Enterobacter aerogenes、Enterobacter amnigenus、Enterobacter asburiae、Enterobacter cloacae、Enterobacter dissolvens、Enterobacter ergoviae、Enterobacter hormaechei、Enterobacter intermedius、Enterobacter nimipressuralis、Enterobacter sakazakii、Enterobacter tayloraeに属する微生物等をあげる

ことができる。

【0049】

クレブシエラ属に属する微生物としては、Klebsiella planticolaに属する微生物等をあげることができる。

セラチア属に属する微生物としては、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia entomophila、Serratia grimesii、Serratia proteamaculans、Serratia odorifera、Serratia plymuthica、Serratia rubidaea、Serratia marcescensに属する微生物等をあげることができる。

【0050】

エルビニア属に属する微生物としては、例えば、Erwinia uredovora、Erwinia carotovora、Erwinia ananas、Erwinia herbicola、Erwinia punctata、Erwinia terreus、Erwinia cacticida、Erwinia chrysanthemi、Erwinia mallotivora、Erwinia persicinus、Erwinia psidii、Erwinia quercina、Erwinia rhapontici、Erwinia rubrifaciens、Erwinia salicisに属する微生物等をあげることができる。

バチルス属に属する微生物としては、Bacillus subtilis、Bacillus megaterium、Bacillus amyloliquefaciens、Bacillus coagulans、Bacillus licheniformis、Bacillus pumilusに属する微生物等をあげることができる。

【0051】

シュードモナス属に属する微生物としては、Pseudomonas putidaに属する微生物等をあげることができる。

アグロバクテリウム属に属する微生物としては、例えば、Agrobacterium radiobacter、Agrobacterium rhizogenes、Agrobacterium rubiに属する微生物等をあげることができる。

【0052】

アナバナ属に属する微生物としては、例えば、Anabaena cylindrica、Anabaena doliolum、Anabaena flosaquaeに属する微生物等をあげることができる。

クロマチウム属に属する微生物としては、例えば、Chromatium buderii、Chromatium tepidum、Chromatium vinosum、Chromatium warmingii、Chromatium fluviatileに属する微生物等をあげることができる。

【0053】

ロドバクター属に属する微生物としては、例えば、Rhodobacter capsulatus、Rhodobacter sphaeroidesに属する微生物等をあげることができる。

ロドシュードモナス属に属する微生物としては、例えば、Rhodopseudomonas blastica、Rhodopseudomonas marina、Rhodopseudomonas palustrisに属する微生物等をあげることができる。

【0054】

ロドスピリウム属に属する微生物としては、例えば、Rhodospirillum rubrum、Rhodospirillum salexigens、Rhodospirillum salinarumに属する微生物等をあげることができる。

ストレプトマイセス属に属する微生物としては、例えば、Streptomyces ambofaciens、Streptomyces aureofaciens、Streptomyces aureus、Streptomyces fungicidicus、Streptomyces griseochromogenes、Streptomyces griseus、Streptomyces lividans、Streptomyces olivogriseus、Streptomyces rameus、Streptomyces tanashiensis、Streptomyces vinaceusに属する微生物等をあげることができる。

【0055】

ザイモモナス属に属する微生物としては、例えば、Zymomonas mobilisに属する微生物等をあげることができる。

上記宿主微生物のうち、扱いが容易であることから、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、アースロバクター属、オーレオバクテリウム属、セルロモナス属、クラビバクター属、クルトバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、ピメロバクター属、エシェ

リヒア属、またはバチルス属に属する微生物が好ましく用いられ、コリネバクテリウムまたはエシェリヒア属または属に属する微生物がより好ましく用いられ、特にコリネバクテリウム属に属する微生物が好ましく用いられる。

【0056】

宿主微生物への組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主微生物へDNAを導入できる方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)〕等をあげることができる。

【0057】

発現ベクターとしては、宿主微生物において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガー・マンハイム社製)、pHelix1 (ロシュ・ダイアグノスティクス社製)、pKK233-2 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-8 (キアゲン社製)、pET-3 (ノバジェン社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescriptII SK(+)、pBluescript II KS(-) (ストラタジーン社製)、pTrS30〔エシェリヒア・コリJM109/pTrS30(FERM BP-5407)より調製〕、pTrS32〔エシェリヒア・コリJM109/pTrS32(FERM BP-5408)より調製〕、pPAC31 (W098/12343)、pUC19〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pSTV28 (宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPA1 (特開昭63-233798)、pCG116、pCG1 (特開平6-277082)、pCS299P (W0 00/63388)等があげられる。

【0058】

プロモーターとしては、宿主微生物中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター (P_{lac})、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、 P_{SE} プロモーター等の、エシェリヒア・コリに属する微生物やファージ等に由来するプロモーター、 $SPO1$ プロモーター、 $SPO2$ プロモーター、 $penP$ プロモーター等をあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、 $lacT7$ プロモーター、 $let I$ プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0059】

また、宿主微生物がコリネバクテリウム属に属する微生物である場合、 P_{54-6} プロモーター〔Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)〕もあげられる。バチルス属に属する微生物である場合、 $xylA$ プロモーター〔Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 594-599 (1991)〕もあげられる。

組換え体DNAは宿主微生物中で自立複製可能であると同時に、上記プロモーター、リボソーム結合配列、本発明に用いられるポリペプチドをコードするDNA、転写終結配列より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0060】

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間は、適当な距離 (例えば6~18塩基) を有していることが好ましい。

転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

このような組換え体DNAとしては、例えばエシェリヒア・コリDH5 α / pCS-CGndh (FERM BP-08633)の保有するプラスミドpCS-CGndhをあげることができる。

【0061】

上記方法によって得られる本発明の微生物としては、例えば実施例に示されるコリネバ

クテリウム・グルタミカム LS-22/pCS-CGndh、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh をあげることができる。

宿主微生物に導入された本発明に用いられるポリペプチドをコードする DNA は、微生物中で組換え体 DNA 上に存在していてもよいし、染色体上に組み込まれていてもよい。

【0062】

該 DNA を染色体上に組み込む方法としては、例えば、*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*、1996年、2325頁、2339頁、アメリカン・ソサエティー・フォー・マイクロバイオロジー刊等に記載のファージやトランスポゾンを用いる方法をあげることができる。

本発明に用いられるポリペプチドをコードする DNA を導入して得られる微生物（以下、本発明の微生物と略す）を培地に培養し、培養物中に L-アミノ酸を生成、蓄積させ、該培養物から L-アミノ酸を採取することにより、L-アミノ酸を製造することができる。

【0063】

培養に用いる培地としては、本発明の微生物が資化することのできる炭素源、窒素源、無機塩類等を含むし、該微生物が生育でき、かつ目的とする L-アミノ酸の生産が効率的に行なえる培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、本発明の微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0064】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびにペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物、各種醗酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0065】

無機塩としては、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常、振とう培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行なう。培養温度は 15℃～50℃ がよく、より好ましくは 20℃～45℃ である。培養時間は通常 5 時間～7 日間、より好ましくは 12 時間～4 日間である。培養中に必要に応じて pH を 3～9 に保持する。pH の調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行なう。

【0066】

また培養中に必要に応じて、ペニシリンやアンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換え体 DNA を用いて DNA を導入した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac* プロモーターを用いた組換え体 DNA を用いて DNA を導入した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、*trp* プロモーターを用いた組換え体 DNA を用いて DNA を導入した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0067】

培養終了後の培養液からのアミノ酸の採取は通常のアミノ酸単離法を用いることができる。すなわち、活性炭を用いる方法、イオン交換樹脂を用いる方法、結晶化法、沈殿法等の方法を単独でまたは組み合わせることによって行うことができる。

以下に実施例を示すが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】

【0068】

(1) コリネバクテリウム・グルタミカム LS-22株をLB培地〔10g/L バクトトリプトン（ディフコ社製）、5g/L イーストエキストラクト（ディフコ社製）および5g/L 塩化ナトリウムを含む培地〕に植菌し、30℃で一晩培養した。培養後、Eikmannsらの方法〔Microbiol., 140, 1817 (1994)〕に準じて、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

配列番号3記載のコリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032のndhの塩基配列に基いて配列番号1および2で表される塩基配列を有するDNAを合成した。

【0069】

該DNA（各0.5 μ mol/L）をプライマーとし、上記染色体DNA（0.1 μ g）を鋳型として、PfuDNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）2.5単位および各200 μ mol/LのdNTP（dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP）を含む反応液40 μ L中でPCRを行なった。

反応終了後、得られた反応液4 μ Lをアガロースゲル電気泳動に供し、公知のコリネバクテリウム・グルタミカムのndhに相当する1.9kbの断片が増幅していることを確認した後、残りの反応液と等量のTE〔10mmol/L トリス-塩酸（pH8.0）、1mmol/L エチレンジアミン四酢酸を含有する溶液〕飽和フェノール/クロロフォルム（1vol/1vol）溶液を混合した。該溶液を遠心分離して得られた上層に、2倍量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃で30分間放置した。該溶液を遠心分離してDNAを得、該DNAを20 μ LのTEに溶解した。

【0070】

該DNA溶解液5 μ LとpGEM^R-T Easy vector（プロメガ社製）0.06 μ gをpGEM^R-T Easy vector systemのライゲーションキット（プロメガ社製）を用いて16℃で16時間反応させ、ndhを含むDNA断片とpGEM^R-T Easy vectorを連結した。

連結反応後の反応液を用いてエシェリヒア・コリDH5 α 株を、エレクトロポレーション法〔Nucleic acid Res., 16, 6127-6145 (1988)〕によって形質転換した。

【0071】

得られた形質転換体を、100 μ g/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布し、30℃で一晩培養した。該寒天培地上に生育したコロニーより常法により従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析することにより、pGEM^R-T Easy vectorにコリネバクテリウム・グルタミカムのndhを含むDNA断片が挿入されたプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpT-CGndhと命名した。

【0072】

pT-CGndh 1 μ gを制限酵素KpnIおよびSalIで切断し、得られたDNA断片を含む溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約2kbのDNA断片を分離した。

コリネ型細菌用の発現ベクターであるpCS299P(WO 00/63388)0.2 μ gを制限酵素KpnIおよびSalIで切断後、得られたDNA断片を含む溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約5.4kbのDNA断片を分離した。

【0073】

上記で得られたndhを含む約2kbのDNA断片とpCS299Pの切断断片（5.4kb）をライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて、16℃で16時間反応させて連結した。

連結反応後の反応液を用いてコリネバクテリウム・グルタミカムLS-22株を、エレクトロポレーション法〔Nucleic acid Res., 16, 6127-6145 (1988)〕を用いて形質転換した。

【0074】

得られた形質転換体を25 μ g/mLのカナマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、30℃で一日間培養した。該寒天培地上に生育したコロニーより、常法によりプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析して、該プラスミドが、pCS299Pにndhを含むDNA断片が挿入されたプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpCS-CGndhと命名した。

プラスミドpCS-CGndhを含有するエシェリヒア・コリDH5 α /pCS-CGndhは、FERM BP-08633として、平成16年2月19日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄

託センター、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) に寄託されている。

【0075】

(2) コリネバクテリウム・グルタミカムLS-22株およびコリネバクテリウム・グルタミカムLS-22株にpCS-CGndhを導入したコリネバクテリウム・グルタミカムLS-22/pCS-CGndh株をそれぞれ、試験管中のLB培地5mLに植菌し、30℃で一晩振とう培養した。培養液1mLを100mLのMG培地〔10g/L グルコース、3g/L リン酸二水素カリウム、3g/L リン酸水素二カリウム、2g/L 塩化アンモニウム、2g/L 尿素、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、10mg/L 硫酸鉄・10水和物、1mg/L 硫酸マンガン・7水和物、30mg/L ビオチン、1mg/L チアミン塩酸塩、20mg/L システイン塩酸塩、0.5g/L カザミノ酸、および1mL/L メタルミックス (990mg/L 硫酸鉄・7水和物、880mg/L 硫酸亜鉛・7水和物、393mg/L 硫酸銅・5水和物、72mg/L 塩化マンガン・4水和物、88mg/L 四ホウ酸ナトリウム・10水和物および37mg/L パラモリブデン酸アンモニウム・4水和物を含有する溶液)を含有する培地〕の入った500mL容三角フラスコに添加し、30℃で80時間、220rpmで振とう培養した。培養後、培養上清のグルタミン酸濃度をHPLCにて定量した。

【0076】

HPLC分析は、移動相として2.94g/L クエン酸ナトリウム、1.42g/L 硫酸ナトリウム、17mL/L n-プロパノールおよび3g/L ラウリル硫酸ナトリウムを含有するpH 2.4の溶液を用い、40℃でカラムAQ-312(YMC社製)に供した後、反応液(18.5g/L ホウ酸、11g/L NaOH、0.6g/L オルトフタルアルデヒド、2mL/L メルカプトエタノールおよび3mL/L Brige-35を含有する溶液)と混合し、励起波長345nm、吸収波長455nmの蛍光分析に供して行った。

【0077】

その結果、コリネバクテリウム・グルタミカムLS-22株が培養液中に1.5g/Lのグルタミン酸を蓄積していたのに対し、コリネバクテリウム・グルタミカムLS-22/pCS-CGndh株は2.3g/Lのグルタミン酸を蓄積していた。

【実施例2】**【0078】**

実施例1と同様に、エレクトロポレーション法を用いてコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752株にpCS-CGndhを導入し、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh株を得た。

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752株およびコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC14752/pCS-CGndh株を、それぞれGS培地〔70g/L グルコース、10g/L コーンステイプリカー、10g/L 肉エキス、10g/L 酵母エキス、5g/L 硫酸アンモニウム、0.5g/L リン酸二水素カリウム、1.5g/L リン酸水素二カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、10mg/L 硫酸鉄・10水和物、10mg/L 硫酸マンガン・7水和物、0.8mg/L 硫酸銅・5水和物、8.3g/L 尿素、5 μ g/L ビオチン、および1mg/L チアミン塩酸塩を含有し、pH 7.2の培地〕5mLの入った試験管に植菌し、30℃で24時間振とう培養した。この培養液2.5mLを25mLのGP培地〔116g/L グルコース、4g/L フラクトース、50g/L 塩化アンモニウム、10mg/L ニコチン酸、0.7g/L リン酸二水素カリウム、0.7g/L リン酸水素二カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、20mg/L 硫酸鉄・10水和物、20mg/L 硫酸マンガン・7水和物、0.8mg/L 硫酸銅・5水和物、5g/L 尿素、0.5 μ g/L ビオチン、1mg/L チアミン塩酸塩および50g/L 炭酸カルシウムを含有し、pH 7.2の培地〕の入った三角フラスコに添加し、30℃で72時間、220rpmで振とう培養した。

【0079】

培養後、培養上清中のグルタミンの蓄積量を実施例1に記載したHPLC条件で定量した。

その結果、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC14752株のグルタミン蓄積量は32.2g/Lであるのに対し、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC14752/pCS-CGndh株のグルタミン蓄積量は33.3g/Lのグルタミンであった。

【実施例3】**【0080】**

実施例 1 と同様に、エレクトロポレーション法を用いてコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069株にpCS-CGndhを導入し、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh株を得た。

コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069株およびコリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh株を、それぞれ、LS培地〔50g/L シュクロース、30g/L コーンステイプリカー、20g/L 肉エキス、20g/L カザミノ酸、8g/L 硫酸アンモニウム、2g/L リン酸二水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、3g/L 尿素、20g/L ペプトン、10mg/L 硫酸鉄・10水和物、10mg/L 硫酸亜鉛・7水和物、20mg/L ニコチン酸、10mg/L パントテン酸カルシウム、0.1mg/L ビオチン、1mg/L チアミン塩酸塩および10g/L 炭酸カルシウムを含有し、pH 7.2の培地〕5mLの入った試験管に植菌し、30℃で24時間振とう培養した。この培養液0.5mLをLP培地〔100g/L 糖蜜（糖分として）、45g/L 硫酸アンモニウム、3g/L 尿素、0.5g/L リン酸二水素カリウム、0.5g/L 硫酸マグネシウム・7水和物、0.3mg/L ビオチンおよび30g/L 炭酸カルシウムを含有し、pH7.0の培地〕5mLの入った試験管に添加し、30℃で72時間、220rpmで振とう培養した。培養終了後、培養上清のリジン濃度をHPLCにて定量した。HPLC分析は、2.94g/L クエン酸ナトリウム、1.42g/L 硫酸ナトリウム、300mL/L アセトニトリル、および3g/L ラウリル硫酸ナトリウムを含有するpH 6.0の溶液を移動相として、40℃でカラムODS-80TS(TOSOH社製)に供した後、反応液(18.5g/L ホウ酸、11g/L 水酸化ナトリウム、0.6g/L オルトフタルアルデヒド、2mL/L メルカプトエタノールおよび3mL/L Brige-35を含有する溶液)と混合し、励起波長345nm、吸収波長455nmの蛍光分析に供して行った。

【0081】

その結果、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069株が24.8g/Lのリジンを蓄積していたのに対し、コリネバクテリウム・グルタミカム FERM BP-1069/pCS-CGndh株は28.6g/Lのリジンを蓄積していた。

【配列表フリーテキスト】

【0082】

配列番号 1 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 2 - 人工配列の説明：合成DNA

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Method for producing L-amino acid

<130> H16-001

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

ctgcttgccc tgcaggtgca ccagcaaacg 30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

cgagctgcgc gacaaccagg aattcagcgg 30

<210> 3

<211> 1404

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 3

atg tca gtt aac cca acc cgc ccc gaa ggc ggc cgt cac cac gtc gtc 48
Met Ser Val Asn Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val
1 5 10 15

gtc atc ggt tct ggt ttt ggt ggc ctt ttt gct gcc aag aac ctg gcc 96

Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Phe	Gly	Gly	Leu	Phe	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ala		
			20					25					30				
aag	gca	gac	gtc	gat	gtc	act	ctg	att	gac	cgc	acc	aac	cac	cac	ctc	144	
Lys	Ala	Asp	Val	Asp	Val	Thr	Leu	Ile	Asp	Arg	Thr	Asn	His	His	Leu		
		35					40					45					
ttc	cag	cca	ctg	ctg	tac	caa	gtg	gca	acc	ggt	atc	ctc	tcc	tcc	ggt	192	
Phe	Gln	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gln	Val	Ala	Thr	Gly	Ile	Leu	Ser	Ser	Gly		
	50					55					60						
gaa	atc	gca	cct	tcc	act	cga	cag	atc	ctg	ggc	tcc	cag	gaa	aac	gtc	240	
Glu	Ile	Ala	Pro	Ser	Thr	Arg	Gln	Ile	Leu	Gly	Ser	Gln	Glu	Asn	Val		
65					70					75					80		
aac	gtc	atc	aag	ggc	gaa	gtc	acc	gac	atc	aac	gtc	gag	tcc	cag	act	288	
Asn	Val	Ile	Lys	Gly	Glu	Val	Thr	Asp	Ile	Asn	Val	Glu	Ser	Gln	Thr		
				85				90						95			
gtg	acc	gcc	tcc	ctg	ggc	gag	ttc	acc	cgc	gtt	ttt	gag	tac	gat	tcc	336	
Val	Thr	Ala	Ser	Leu	Gly	Glu	Phe	Thr	Arg	Val	Phe	Glu	Tyr	Asp	Ser		
			100					105						110			
ttg	gtc	gtt	ggt	gct	ggc	gca	ggt	cag	tcc	tac	ttc	ggc	aat	gat	cac	384	
Leu	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gln	Ser	Tyr	Phe	Gly	Asn	Asp	His		
		115					120					125					
ttc	gct	gag	ttc	gca	cct	ggc	atg	aag	tcc	atc	gac	gat	gca	ctg	gag	432	
Phe	Ala	Glu	Phe	Ala	Pro	Gly	Met	Lys	Ser	Ile	Asp	Asp	Ala	Leu	Glu		
	130					135					140						
att	cgt	gca	cgc	atc	atc	ggt	gct	ttc	gag	cgc	gct	gag	atc	tgc	gag	480	
Ile	Arg	Ala	Arg	Ile	Ile	Gly	Ala	Phe	Glu	Arg	Ala	Glu	Ile	Cys	Glu		
145					150					155					160		
gat	cca	gct	gag	cgc	gaa	cgc	ctg	ctc	acc	ttc	gtc	gtt	gtt	ggc	gct	528	
Asp	Pro	Ala	Glu	Arg	Glu	Arg	Leu	Leu	Thr	Phe	Val	Val	Val	Gly	Ala		
				165					170					175			
ggc	cca	acc	ggt	gtt	gag	ctt	gct	ggc	cag	ttg	gct	gag	atg	gct	cac	576	
Gly	Pro	Thr	Gly	Val	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Leu	Ala	Glu	Met	Ala	His		
			180					185					190				
cgc	acc	ctt	gct	ggt	gag	tac	aag	aac	ttc	aac	acc	aac	tcc	gca	aag	624	
Arg	Thr	Leu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Lys	Asn	Phe	Asn	Thr	Asn	Ser	Ala	Lys		
		195					200					205					
atc	atc	ctg	ctt	gat	ggt	gct	cca	cag	gtt	ctt	cct	cca	ttc	ggt	aag	672	
Ile	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Pro	Pro	Phe	Gly	Lys		
		210				215					220						

cgc cta ggc cgc aac gca cag cgc acc ctg gaa aag atg ggt gtc aac 720
 Arg Leu Gly Arg Asn Ala Gln Arg Thr Leu Glu Lys Met Gly Val Asn
 225 230 235 240

gtt cgc ctg aac gct atg gtc acc aac gtt gac gct acc tcg gtc acc 768
 Val Arg Leu Asn Ala Met Val Thr Asn Val Asp Ala Thr Ser Val Thr
 245 250 255

tac aag acc aag gac ggc gaa gag cac acc atc gaa tct ttc tgc aag 816
 Tyr Lys Thr Lys Asp Gly Glu Glu His Thr Ile Glu Ser Phe Cys Lys
 260 265 270

att tgg tcc gct ggt gtt gcg gca tcc cca ctg ggc aag ctc gtc gca 864
 Ile Trp Ser Ala Gly Val Ala Ala Ser Pro Leu Gly Lys Leu Val Ala
 275 280 285

gag cag acc ggt gtt gag acc gac cgc gca ggc cgc gtc atg gtt aac 912
 Glu Gln Thr Gly Val Glu Thr Asp Arg Ala Gly Arg Val Met Val Asn
 290 295 300

gat gac ctg tct gtt ggc gat cag aag aac gtc ttc gtt gtt ggc gac 960
 Asp Asp Leu Ser Val Gly Asp Gln Lys Asn Val Phe Val Val Gly Asp
 305 310 315 320

atg atg aac tac aac aac ctc cct ggt gtt gct cag gta gca atc cag 1008
 Met Met Asn Tyr Asn Asn Leu Pro Gly Val Ala Gln Val Ala Ile Gln
 325 330 335

agt ggt gag tac gtt gct gag cag atc gaa gct gag gtt gaa ggc cgc 1056
 Ser Gly Glu Tyr Val Ala Glu Gln Ile Glu Ala Glu Val Glu Gly Arg
 340 345 350

tcc aac acc gag cgc gaa gct ttc gat tac ttc gac aag ggc tcc atg 1104
 Ser Asn Thr Glu Arg Glu Ala Phe Asp Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Met
 355 360 365

gct acc att tcc cgc ttc tcc gca gtg gtg aag atg ggc aag gtt gag 1152
 Ala Thr Ile Ser Arg Phe Ser Ala Val Val Lys Met Gly Lys Val Glu
 370 375 380

gtc acc ggc ttc atc ggt tgg gtt ctg tgg ttg gct gtt cac atc atg 1200
 Val Thr Gly Phe Ile Gly Trp Val Leu Trp Leu Ala Val His Ile Met
 385 390 395 400

ttc ctg gtt ggc ttc cgc aac cgt ttc gtc tcc gca atc agc tgg ggc 1248
 Phe Leu Val Gly Phe Arg Asn Arg Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Gly
 405 410 415

ctg aac gca ctg tcc cgc aag cgt tgg aac ctg gca acc acc cgc cag 1296

Leu Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg Gln
420 425 430

cag ctc cac tca cgc acc acg ctg tcc aag ttc gct cac gag ctt gag 1344
Gln Leu His Ser Arg Thr Thr Leu Ser Lys Phe Ala His Glu Leu Glu
435 440 445

gaa gca tct tct gat ctt cca atc gag ctg cgc gac aac cag cgt ttc 1392
Glu Ala Ser Ser Asp Leu Pro Ile Glu Leu Arg Asp Asn Gln Arg Phe
450 455 460

agc gga aag taa 1404
Ser Gly Lys
465

<210> 4
<211> 467
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<400> 4

Met Ser Val Asn Pro Thr Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val
1 5 10 15

Val Ile Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Lys Asn Leu Ala
20 25 30

Lys Ala Asp Val Asp Val Thr Leu Ile Asp Arg Thr Asn His His Leu
35 40 45

Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Ser Ser Gly
50 55 60

Glu Ile Ala Pro Ser Thr Arg Gln Ile Leu Gly Ser Gln Glu Asn Val
65 70 75 80

Asn Val Ile Lys Gly Glu Val Thr Asp Ile Asn Val Glu Ser Gln Thr
85 90 95

Val Thr Ala Ser Leu Gly Glu Phe Thr Arg Val Phe Glu Tyr Asp Ser
100 105 110

Leu Val Val Gly Ala Gly Ala Gly Gln Ser Tyr Phe Gly Asn Asp His
115 120 125

Phe Ala Glu Phe Ala Pro Gly Met Lys Ser Ile Asp Asp Ala Leu Glu
130 135 140

Ile Arg Ala Arg Ile Ile Gly Ala Phe Glu Arg Ala Glu Ile Cys Glu

145											150											155											160
Asp	Pro	Ala	Glu	Arg	Glu	Arg	Leu	Leu	Thr	Phe	Val	Val	Val	Gly	Ala																		
				165								170								175													
Gly	Pro	Thr	Gly	Val	Glu	Leu	Ala	Gly	Gln	Leu	Ala	Glu	Met	Ala	His																		
				180								185								190													
Arg	Thr	Leu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Lys	Asn	Phe	Asn	Thr	Asn	Ser	Ala	Lys																		
				195								200								205													
Ile	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Pro	Pro	Phe	Gly	Lys																		
				210								215								220													
Arg	Leu	Gly	Arg	Asn	Ala	Gln	Arg	Thr	Leu	Glu	Lys	Met	Gly	Val	Asn																		
225												230								235								240					
Val	Arg	Leu	Asn	Ala	Met	Val	Thr	Asn	Val	Asp	Ala	Thr	Ser	Val	Thr																		
				245								250								255													
Tyr	Lys	Thr	Lys	Asp	Gly	Glu	Glu	His	Thr	Ile	Glu	Ser	Phe	Cys	Lys																		
				260								265								270													
Ile	Trp	Ser	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Ser	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Val	Ala																		
				275								280								285													
Glu	Gln	Thr	Gly	Val	Glu	Thr	Asp	Arg	Ala	Gly	Arg	Val	Met	Val	Asn																		
290								295								300																	
Asp	Asp	Leu	Ser	Val	Gly	Asp	Gln	Lys	Asn	Val	Phe	Val	Val	Gly	Asp																		
305								310								315								320									
Met	Met	Asn	Tyr	Asn	Asn	Leu	Pro	Gly	Val	Ala	Gln	Val	Ala	Ile	Gln																		
				325								330								335													
Ser	Gly	Glu	Tyr	Val	Ala	Glu	Gln	Ile	Glu	Ala	Glu	Val	Glu	Gly	Arg																		
				340								345								350													
Ser	Asn	Thr	Glu	Arg	Glu	Ala	Phe	Asp	Tyr	Phe	Asp	Lys	Gly	Ser	Met																		
				355								360								365													
Ala	Thr	Ile	Ser	Arg	Phe	Ser	Ala	Val	Val	Lys	Met	Gly	Lys	Val	Glu																		
				370								375								380													
Val	Thr	Gly	Phe	Ile	Gly	Trp	Val	Leu	Trp	Leu	Ala	Val	His	Ile	Met																		
385								390								395								400									
Phe	Leu	Val	Gly	Phe	Arg	Asn	Arg	Phe	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Trp	Gly																		
				405								410								415													

Leu Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg Gln
 420 425 430

Gln Leu His Ser Arg Thr Thr Leu Ser Lys Phe Ala His Glu Leu Glu
 435 440 445

Glu Ala Ser Ser Asp Leu Pro Ile Glu Leu Arg Asp Asn Gln Arg Phe
 450 455 460

Ser Gly Lys
 465

<210> 5

<211> 1362

<212> DNA

<213> Corynebacterium diphtheriae

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 5

atg act aac acc cca ttt cgc cca gaa ggt gga cgc cac cac gtt gta 48
 Met Thr Asn Thr Pro Phe Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val
 1 5 10 15

gtt att ggc tcc ggc ttc ggt gga cta ttc gca gtt caa aac ctc aaa 96
 Val Ile Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Phe Ala Val Gln Asn Leu Lys
 20 25 30

gat gca gat gtc gat atc acc ctc atc gac cgg aca aac cac cac ctt 144
 Asp Ala Asp Val Asp Ile Thr Leu Ile Asp Arg Thr Asn His His Leu
 35 40 45

ttc cag ccg ttg ctt tac caa gta gca acc ggt atc ttg tcg tct ggt 192
 Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Ser Ser Gly
 50 55 60

gaa atc gca cca caa acg cgt caa gtt ctt gca cag caa aat aat gtg 240
 Glu Ile Ala Pro Gln Thr Arg Gln Val Leu Ala Gln Gln Asn Asn Val
 65 70 75 80

cac gtt ctt aag gct gaa gtc acc gac att gac acc gaa tcg aag acg 288
 His Val Leu Lys Ala Glu Val Thr Asp Ile Asp Thr Glu Ser Lys Thr
 85 90 95

gtc gtc gca gac ttg gat gat tat tct aaa aca att gaa tac gat tcc 336
 Val Val Ala Asp Leu Asp Asp Tyr Ser Lys Thr Ile Glu Tyr Asp Ser
 100 105 110

ctg atc gtc gcc gct ggt gca ggt cag tct tac ttc gga aat gat cac 384
 Leu Ile Val Ala Ala Gly Ala Gly Gln Ser Tyr Phe Gly Asn Asp His
 115 120 125

ttc gcg gaa ttc gcg ccg ggt atg aaa aca atc gat gat gca ctc gaa 432
 Phe Ala Glu Phe Ala Pro Gly Met Lys Thr Ile Asp Asp Ala Leu Glu
 130 135 140

ctg cgt gcg cgc atc atc ggc gct ttc gaa cgc gca gaa atg tgc gaa 480
 Leu Arg Ala Arg Ile Ile Gly Ala Phe Glu Arg Ala Glu Met Cys Glu
 145 150 155 160

gat ccc aaa gaa cgt gaa cgc ctc ttg act ttt gtt atc gtt ggc gca 528
 Asp Pro Lys Glu Arg Glu Arg Leu Leu Thr Phe Val Ile Val Gly Ala
 165 170 175

gga cca aca ggc gta gaa ctt gca ggt cag ctg gcc gaa atg gca cac 576
 Gly Pro Thr Gly Val Glu Leu Ala Gly Gln Leu Ala Glu Met Ala His
 180 185 190

cgc acg ttg tct gga gag tac acg cag ttc acg cct tcc aac gcg aag 624
 Arg Thr Leu Ser Gly Glu Tyr Thr Gln Phe Thr Pro Ser Asn Ala Lys
 195 200 205

atc atc ctg ctt gac ggc gct cct cag gtg ctt cca ccg ttc ggc aag 672
 Ile Ile Leu Leu Asp Gly Ala Pro Gln Val Leu Pro Pro Phe Gly Lys
 210 215 220

cgt ttg ggt cgt act gca cag cgt gaa tta gaa aag att ggt gta acg 720
 Arg Leu Gly Arg Thr Ala Gln Arg Glu Leu Glu Lys Ile Gly Val Thr
 225 230 235 240

gtc aag ctg aac gct atc gtt acc ggc gta gac gaa aac tca gtg aca 768
 Val Lys Leu Asn Ala Ile Val Thr Gly Val Asp Glu Asn Ser Val Thr
 245 250 255

tat aag tcc acc gtt gat gat tct ttg cac acg atc gat tcc ttc tgc 816
 Tyr Lys Ser Thr Val Asp Asp Ser Leu His Thr Ile Asp Ser Phe Cys
 260 265 270

aag atc tgg tcg gca ggc gta gcc gct tcc cca cta ggc aaa cta gtt 864
 Lys Ile Trp Ser Ala Gly Val Ala Ala Ser Pro Leu Gly Lys Leu Val
 275 280 285

gca gag cag ctt ggt gtc gag gtt gat cgt gca gga cgc gtc cca gtc 912
 Ala Glu Gln Leu Gly Val Glu Val Asp Arg Ala Gly Arg Val Pro Val
 290 295 300

aac gaa gat ctt tct gtt ggc gac gat aag aac gtc ttt gtt att ggc 960

Asn Glu Asp Leu Ser Val Gly Asp Asp Lys Asn Val Phe Val Ile Gly
305 310 315 320

gat atg atg tcg ctc aac agg ctt ccg gga gtc gca cag gta gca atc 1008
Asp Met Met Ser Leu Asn Arg Leu Pro Gly Val Ala Gln Val Ala Ile
325 330 335

caa ggc ggt gaa tac gtt gct gag cag att gct gct ggg gtc gag gga 1056
Gln Gly Gly Glu Tyr Val Ala Glu Gln Ile Ala Ala Gly Val Glu Gly
340 345 350

cgt tcc tcg tct gaa cgc cca gcc ttt gaa tac tac gac aag ggt tcg 1104
Arg Ser Ser Ser Glu Arg Pro Ala Phe Glu Tyr Tyr Asp Lys Gly Ser
355 360 365

atg gct acg gtg tcg cgc ttt aac gcc gtt gtg aag ctt gga aaa gtt 1152
Met Ala Thr Val Ser Arg Phe Asn Ala Val Val Lys Leu Gly Lys Val
370 375 380

gaa gtt acg gga ttt att ggc tgg gtc atg tgg ctt ctc gtc cac ttg 1200
Glu Val Thr Gly Phe Ile Gly Trp Val Met Trp Leu Leu Val His Leu
385 390 395 400

atg ttc ttg gtc ggc ttc cgc aac cga gca act gcg gct ttc tct tgg 1248
Met Phe Leu Val Gly Phe Arg Asn Arg Ala Thr Ala Ala Phe Ser Trp
405 410 415

ggc atc aat gcg ctt tca cgt aag cgt tgg aac ctc gcc acc act cgt 1296
Gly Ile Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg
420 425 430

cag cag ctt cac ggc cgt act ggt ttg caa aaa ctt act gcg ctc gtc 1344
Gln Gln Leu His Gly Arg Thr Gly Leu Gln Lys Leu Thr Ala Leu Val
435 440 445

gat acc gcc gaa aag aag 1362
Asp Thr Ala Glu Lys Lys
450

<210> 6
<211> 454
<212> PRT
<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 6

Met Thr Asn Thr Pro Phe Arg Pro Glu Gly Gly Arg His His Val Val
1 5 10 15

Val Ile Gly Ser Gly Phe Gly Gly Leu Phe Ala Val Gln Asn Leu Lys

20 25 30

Asp Ala Asp Val Asp Ile Thr Leu Ile Asp Arg Thr Asn His His Leu
35 40 45

Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala Thr Gly Ile Leu Ser Ser Gly
50 55 60

Glu Ile Ala Pro Gln Thr Arg Gln Val Leu Ala Gln Gln Asn Asn Val
65 70 75 80

His Val Leu Lys Ala Glu Val Thr Asp Ile Asp Thr Glu Ser Lys Thr
85 90 95

Val Val Ala Asp Leu Asp Asp Tyr Ser Lys Thr Ile Glu Tyr Asp Ser
100 105 110

Leu Ile Val Ala Ala Gly Ala Gly Gln Ser Tyr Phe Gly Asn Asp His
115 120 125

Phe Ala Glu Phe Ala Pro Gly Met Lys Thr Ile Asp Asp Ala Leu Glu
130 135 140

Leu Arg Ala Arg Ile Ile Gly Ala Phe Glu Arg Ala Glu Met Cys Glu
145 150 155 160

Asp Pro Lys Glu Arg Glu Arg Leu Leu Thr Phe Val Ile Val Gly Ala
165 170 175

Gly Pro Thr Gly Val Glu Leu Ala Gly Gln Leu Ala Glu Met Ala His
180 185 190

Arg Thr Leu Ser Gly Glu Tyr Thr Gln Phe Thr Pro Ser Asn Ala Lys
195 200 205

Ile Ile Leu Leu Asp Gly Ala Pro Gln Val Leu Pro Pro Phe Gly Lys
210 215 220

Arg Leu Gly Arg Thr Ala Gln Arg Glu Leu Glu Lys Ile Gly Val Thr
225 230 235 240

Val Lys Leu Asn Ala Ile Val Thr Gly Val Asp Glu Asn Ser Val Thr
245 250 255

Tyr Lys Ser Thr Val Asp Asp Ser Leu His Thr Ile Asp Ser Phe Cys
260 265 270

Lys Ile Trp Ser Ala Gly Val Ala Ala Ser Pro Leu Gly Lys Leu Val
275 280 285

Ala Glu Gln Leu Gly Val Glu Val Asp Arg Ala Gly Arg Val Pro Val
290 295 300

Asn Glu Asp Leu Ser Val Gly Asp Asp Lys Asn Val Phe Val Ile Gly
305 310 315 320

Asp Met Met Ser Leu Asn Arg Leu Pro Gly Val Ala Gln Val Ala Ile
325 330 335

Gln Gly Gly Glu Tyr Val Ala Glu Gln Ile Ala Ala Gly Val Glu Gly
340 345 350

Arg Ser Ser Ser Glu Arg Pro Ala Phe Glu Tyr Tyr Asp Lys Gly Ser
355 360 365

Met Ala Thr Val Ser Arg Phe Asn Ala Val Val Lys Leu Gly Lys Val
370 375 380

Glu Val Thr Gly Phe Ile Gly Trp Val Met Trp Leu Leu Val His Leu
385 390 395 400

Met Phe Leu Val Gly Phe Arg Asn Arg Ala Thr Ala Ala Phe Ser Trp
405 410 415

Gly Ile Asn Ala Leu Ser Arg Lys Arg Trp Asn Leu Ala Thr Thr Arg
420 425 430

Gln Gln Leu His Gly Arg Thr Gly Leu Gln Lys Leu Thr Ala Leu Val
435 440 445

Asp Thr Ala Glu Lys Lys
450

<210> 7

<211> 1302

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 7

ttg act acg cca ttg aaa aag att gtg att gtc ggc ggc ggt gct ggt 48
Met Thr Thr Pro Leu Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly
1 5 10 15

ggg ctg gaa atg gca aca cag ctg ggg cat aag ctg gga cgc aag aaa 96

Gly Leu Glu Met Ala Thr Gln Leu Gly His Lys Leu Gly Arg Lys Lys
 20 25 30
 aaa gcc aaa att acg ctg gtc gat cgt aac cac agc cac ctg tgg aaa 144
 Lys Ala Lys Ile Thr Leu Val Asp Arg Asn His Ser His Leu Trp Lys
 35 40 45
 ccg ctg ctg cac gaa gtg gcg act ggc tcg ctt gat gaa ggc gtc gat 192
 Pro Leu Leu His Glu Val Ala Thr Gly Ser Leu Asp Glu Gly Val Asp
 50 55 60
 gcg ttg agc tat ctg gcc cat gcg cgc aat cat ggt ttc cag ttc cag 240
 Ala Leu Ser Tyr Leu Ala His Ala Arg Asn His Gly Phe Gln Phe Gln
 65 70 75 80
 ctg ggt tcc gtc att gat att gat cgt gaa gcg aaa aca atc act att 288
 Leu Gly Ser Val Ile Asp Ile Asp Arg Glu Ala Lys Thr Ile Thr Ile
 85 90 95
 gca gaa ctg cgc gac gag aaa ggt gaa ctg ctg gtt ccg gaa cgt aaa 336
 Ala Glu Leu Arg Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Val Pro Glu Arg Lys
 100 105 110
 atc gcc tat gac acc ctg gta atg gcg ctg ggt agc acc tct aac gat 384
 Ile Ala Tyr Asp Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp
 115 120 125
 ttc aat acg cca ggt gtc aaa gag aac tgc att ttc ctc gat aac ccg 432
 Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu Asn Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro
 130 135 140
 cac cag gcg cgt cgc ttc cac cag gag atg ctg aat ttg ttc ctg aaa 480
 His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys
 145 150 155 160
 tac tcc gcc aac ctg ggc gcg aat ggc aaa gtg aac att gcg att gtc 528
 Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val
 165 170 175
 ggc ggc ggc gcg acg ggt gta gaa ctc tcc gct gaa ttg cac aac gcg 576
 Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala
 180 185 190
 gtc aag caa ctg cac agc tac ggt tac aaa ggc ctg acc aac gaa gcc 624
 Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Glu Ala
 195 200 205
 ctg aac gta acg ctg gta gaa gcg gga gaa cgt att ttg cct gcg tta 672
 Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu
 210 215 220

ccg cca cgt atc tct gct gcg gcc cac aac gag cta acg aaa ctt ggc 720
 Pro Pro Arg Ile Ser Ala Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly
 225 230 235 240

gtt cgc gtg ctg acg caa acc atg gtc acc agt gct gat gaa ggc ggc 768
 Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly
 245 250 255

ctg cac act aaa gat ggc gaa tat att gag gct gat ctg atg gta tgg 816
 Leu His Thr Lys Asp Gly Glu Tyr Ile Glu Ala Asp Leu Met Val Trp
 260 265 270

gca gcc ggg atc aaa gcg cca gac ttc ctg aaa gat atc ggt ggt ctt 864
 Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Gly Gly Leu
 275 280 285

gaa act aac cgt atc aac cag ctg gtg gtg gaa ccg acg ctg caa acc 912
 Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr
 290 295 300

acc cgc gat cca gac att tac gct att ggc gac tgc gcg tca tgc ccg 960
 Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro
 305 310 315 320

cgt ccg gaa ggg ggc ttt gtt ccg ccg cgt gct cag gct gca cac cag 1008
 Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln
 325 330 335

atg gcg act tgc gca atg aac aac att ctg gcg cag atg aac ggt aag 1056
 Met Ala Thr Cys Ala Met Asn Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys
 340 345 350

ccg ctg aaa aat tat cag tat aaa gat cat ggt tcg ctg gta tcg ctg 1104
 Pro Leu Lys Asn Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu
 355 360 365

tcg aac ttc tcc acc gtc ggt agc ctg atg ggt aac ctg acg cgc ggc 1152
 Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly
 370 375 380

tca atg atg att gaa gga cga att gcg cgc ttt gta tat atc tcg cta 1200
 Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu
 385 390 395 400

tac cga atg cat cag att gcg ctg cat ggt tac ttt aaa acc gga tta 1248
 Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu
 405 410 415

atg atg ctg gtg ggg agt att aac cgc gtt atc cgt ccg cgt ttg aag 1296

Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys
 420 425 430

ttg cat
 Leu His

1302

<210> 8
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 8

Met Thr Thr Pro Leu Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Met Ala Thr Gln Leu Gly His Lys Leu Gly Arg Lys Lys
 20 25 30

Lys Ala Lys Ile Thr Leu Val Asp Arg Asn His Ser His Leu Trp Lys
 35 40 45

Pro Leu Leu His Glu Val Ala Thr Gly Ser Leu Asp Glu Gly Val Asp
 50 55 60

Ala Leu Ser Tyr Leu Ala His Ala Arg Asn His Gly Phe Gln Phe Gln
 65 70 75 80

Leu Gly Ser Val Ile Asp Ile Asp Arg Glu Ala Lys Thr Ile Thr Ile
 85 90 95

Ala Glu Leu Arg Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Val Pro Glu Arg Lys
 100 105 110

Ile Ala Tyr Asp Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp
 115 120 125

Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu Asn Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro
 130 135 140

His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys
 145 150 155 160

Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val
 165 170 175

Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala
 180 185 190

Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Glu Ala
 195 200 205

Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu
210 215 220

Pro Pro Arg Ile Ser Ala Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly
225 230 235 240

Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly
245 250 255

Leu His Thr Lys Asp Gly Glu Tyr Ile Glu Ala Asp Leu Met Val Trp
260 265 270

Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Gly Gly Leu
275 280 285

Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr
290 295 300

Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro
305 310 315 320

Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln
325 330 335

Met Ala Thr Cys Ala Met Asn Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys
340 345 350

Pro Leu Lys Asn Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu
355 360 365

Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly
370 375 380

Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu
385 390 395 400

Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu
405 410 415

Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys
420 425 430

Leu His

<210> 9

<211> 1296

<212> DNA

<213> Pseudomonas fluorescens

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 9

atg act cat cgt att gtc atc gtt ggc ggc ggc gcc ggc ggt ctg gag	48
Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Leu Glu	
1 5 10 15	
ttg gct acc cgt ctg ggt aag act ctg ggc aag cgt ggc acg gcc agt	96
Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Leu Gly Lys Arg Gly Thr Ala Ser	
20 25 30	
gtg atg ctg gtc gac gcg aac ctg acc cac atc tgg aaa ccg cta ctg	144
Val Met Leu Val Asp Ala Asn Leu Thr His Ile Trp Lys Pro Leu Leu	
35 40 45	
cac gaa gtg gcc gcc ggc tcc ttg aac tcc tcc gaa gac gaa ctc aac	192
His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Ser Glu Asp Glu Leu Asn	
50 55 60	
tat gtc gcc cag gca aaa tgg aac cac ttc gag ttc cag ctc ggg cgc	240
Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn His Phe Glu Phe Gln Leu Gly Arg	
65 70 75 80	
atg agc ggc ctg gat cgc gag cgc aag aga atc caa ctg gcc gcc acc	288
Met Ser Gly Leu Asp Arg Glu Arg Lys Arg Ile Gln Leu Ala Ala Thr	
85 90 95	
tat gac gag acc ggc gtc gag ctg ttg ccg gcc cgg gaa ctg ggc tac	336
Tyr Asp Glu Thr Gly Val Glu Leu Leu Pro Ala Arg Glu Leu Gly Tyr	
100 105 110	
gac acc ctg gtg att gcc gtc ggc agc acc acc aat gac ttc ggc acc	384
Asp Thr Leu Val Ile Ala Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr	
115 120 125	
gaa ggc gcg gcg cag cac tgc ctg ttc ctc gac acc cgc aaa cag gcc	432
Glu Gly Ala Ala Gln His Cys Leu Phe Leu Asp Thr Arg Lys Gln Ala	
130 135 140	
gag cgc ttc cat cag caa ttg ctg cac cac tat ctg cgc gcc cac gcc	480
Glu Arg Phe His Gln Gln Leu Leu His His Tyr Leu Arg Ala His Ala	
145 150 155 160	
ggg cag acc gat atc gtc gag cgc atc agc gtc gcc att gtc ggc gcc	528
Gly Gln Thr Asp Ile Val Glu Arg Ile Ser Val Ala Ile Val Gly Ala	
165 170 175	

ggt gcg acc ggg gtc gaa ctg gcc gcc gag ctg cat aat gcc gcc cac 576
 Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu His Asn Ala Ala His
 180 185 190

gaa ctg cac gcc tac ggc ctg gac cgg atc aaa ccg gag aac atg cac 624
 Glu Leu His Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Ile Lys Pro Glu Asn Met His
 195 200 205

atc acc ctg atc gag gcc ggg cca cgc gtc ttg ccg gcc ctg ccg gag 672
 Ile Thr Leu Ile Glu Ala Gly Pro Arg Val Leu Pro Ala Leu Pro Glu
 210 215 220

cgt atc ggc ggg ccg gtg cac aag acc ctg gaa aaa ctc ggg gtc aac 720
 Arg Ile Gly Gly Pro Val His Lys Thr Leu Glu Lys Leu Gly Val Asn
 225 230 235 240

gtc atg acc aac gcc gcc gtc agc cag gtg acc gcc gac agc ctg att 768
 Val Met Thr Asn Ala Ala Val Ser Gln Val Thr Ala Asp Ser Leu Ile
 245 250 255

acc gcg gac ggc aaa gtg atc gac gcg agc ctg aaa gtc tgg gcc gcc 816
 Thr Ala Asp Gly Lys Val Ile Asp Ala Ser Leu Lys Val Trp Ala Ala
 260 265 270

ggg att cgc gcc ccg gac ttc ctc aag gac atc gac ggg ctg gag acc 864
 Gly Ile Arg Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Asp Gly Leu Glu Thr
 275 280 285

aac cgg atc aac cag ttg cac gtg ctg ccc act ttg cag acc acc cgc 912
 Asn Arg Ile Asn Gln Leu His Val Leu Pro Thr Leu Gln Thr Thr Arg
 290 295 300

gac gag aac atc ttc gcc ttc ggc gac tgc gcc gcc tgc ccg caa ccc 960
 Asp Glu Asn Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ala Cys Pro Gln Pro
 305 310 315 320

ggc agc gag cgc aac gtc cca cct cgc gcc cag gcc gca cac cag caa 1008
 Gly Ser Glu Arg Asn Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln
 325 330 335

gcc tca ctg ctg gcc aaa tcc ttg aag ctg cgg atc gag ggc aag gcc 1056
 Ala Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu Lys Leu Arg Ile Glu Gly Lys Ala
 340 345 350

ctg ccg gaa tac aaa tac acc gac tac ggc tcg ctg atc tcg ctg tcg 1104
 Leu Pro Glu Tyr Lys Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser
 355 360 365

cgg ttc tcg gca gtg ggc aac ctg atg ggt aac ctg acc ggc agc gtg 1152

Arg Phe Ser Ala Val Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Ser Val
 370 375 380

atg ctc gaa ggc tgg ctg gcg cgg atg ttc tat gtg tcg ctg tac cgc 1200
 Met Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Met Phe Tyr Val Ser Leu Tyr Arg
 385 390 395 400

atg cac cag atg gcg ctg tac ggc atg ttc cgc acg gcc atg ttg atg 1248
 Met His Gln Met Ala Leu Tyr Gly Met Phe Arg Thr Ala Met Leu Met
 405 410 415

ctg ggt agc aag atc ggg cgt ggg acc gag cct cgg ctg aag ctg cac 1296
 Leu Gly Ser Lys Ile Gly Arg Gly Thr Glu Pro Arg Leu Lys Leu His
 420 425 430

<210> 10

<211> 432

<212> PRT

<213> Pseudomonas fluorescens

<400> 10

Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Leu Gly Lys Arg Gly Thr Ala Ser
 20 25 30

Val Met Leu Val Asp Ala Asn Leu Thr His Ile Trp Lys Pro Leu Leu
 35 40 45

His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Ser Glu Asp Glu Leu Asn
 50 55 60

Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn His Phe Glu Phe Gln Leu Gly Arg
 65 70 75 80

Met Ser Gly Leu Asp Arg Glu Arg Lys Arg Ile Gln Leu Ala Ala Thr
 85 90 95

Tyr Asp Glu Thr Gly Val Glu Leu Leu Pro Ala Arg Glu Leu Gly Tyr
 100 105 110

Asp Thr Leu Val Ile Ala Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr
 115 120 125

Glu Gly Ala Ala Gln His Cys Leu Phe Leu Asp Thr Arg Lys Gln Ala
 130 135 140

Glu Arg Phe His Gln Gln Leu Leu His His Tyr Leu Arg Ala His Ala
 145 150 155 160

Gly Gln Thr Asp Ile Val Glu Arg Ile Ser Val Ala Ile Val Gly Ala
165 170 175

Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu His Asn Ala Ala His
180 185 190

Glu Leu His Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Ile Lys Pro Glu Asn Met His
195 200 205

Ile Thr Leu Ile Glu Ala Gly Pro Arg Val Leu Pro Ala Leu Pro Glu
210 215 220

Arg Ile Gly Gly Pro Val His Lys Thr Leu Glu Lys Leu Gly Val Asn
225 230 235 240

Val Met Thr Asn Ala Ala Val Ser Gln Val Thr Ala Asp Ser Leu Ile
245 250 255

Thr Ala Asp Gly Lys Val Ile Asp Ala Ser Leu Lys Val Trp Ala Ala
260 265 270

Gly Ile Arg Ala Pro Asp Phe Leu Lys Asp Ile Asp Gly Leu Glu Thr
275 280 285

Asn Arg Ile Asn Gln Leu His Val Leu Pro Thr Leu Gln Thr Thr Arg
290 295 300

Asp Glu Asn Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ala Cys Pro Gln Pro
305 310 315 320

Gly Ser Glu Arg Asn Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln
325 330 335

Ala Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu Lys Leu Arg Ile Glu Gly Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Glu Tyr Lys Tyr Thr Asp Tyr Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser
355 360 365

Arg Phe Ser Ala Val Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Ser Val
370 375 380

Met Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Met Phe Tyr Val Ser Leu Tyr Arg
385 390 395 400

Met His Gln Met Ala Leu Tyr Gly Met Phe Arg Thr Ala Met Leu Met
405 410 415

Leu Gly Ser Lys Ile Gly Arg Gly Thr Glu Pro Arg Leu Lys Leu His

420

425

430

<210> 11
 <211> 1296
 <212> DNA
 <213> Azotobacter vinelandii

<220>
 <221> CDS
 <222>

<400> 11

atg act cat cgt atc gta atc gtc ggc ggt ggc gct ggc ggc gtg gaa	48
Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Val Glu	
1 5 10 15	
ctc gct acc cgc ctc ggc aag acc atg ggc agg aac ttc cag gcg aag	96
Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Met Gly Arg Asn Phe Gln Ala Lys	
20 25 30	
atc acc ctg gtc gac gcc aac atg acc cac ctg tgg aaa ccg ctg ctg	144
Ile Thr Leu Val Asp Ala Asn Met Thr His Leu Trp Lys Pro Leu Leu	
35 40 45	
cac gaa gtc gcc gcc ggc tcg ctg aac tcg acc ggc gac gaa ctg aac	192
His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Thr Gly Asp Glu Leu Asn	
50 55 60	
tat gtg gcc cag gcc aaa tgg aac aac ttc gag ttc cag tac ggc cgc	240
Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn Asn Phe Glu Phe Gln Tyr Gly Arg	
65 70 75 80	
atg tgc ggt ctg gac cgg gcc aac aag cgt atc cgc ctg gcg gcc cag	288
Met Cys Gly Leu Asp Arg Ala Asn Lys Arg Ile Arg Leu Ala Ala Gln	
85 90 95	
ccg gcc cag gaa gat cgc gcg ccc ctg ccc gag cgc gaa ctg gaa tac	336
Pro Ala Gln Glu Asp Arg Ala Pro Leu Pro Glu Arg Glu Leu Glu Tyr	
100 105 110	
gac acc ctg gtc ctt tcc gtc ggc agc acc acc aat gac ttc ggc acc	384
Asp Thr Leu Val Leu Ser Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr	
115 120 125	
ccg ggc gcc gcc gag aac tgt att ttc ctg gaa ggc cgc gac cag gcc	432
Pro Gly Ala Ala Glu Asn Cys Ile Phe Leu Glu Gly Arg Asp Gln Ala	
130 135 140	
gag cgt ttc cgc cgt ccg ctg ctc agc cac tac ttg cgt gcc cac gcc	480
Glu Arg Phe Arg Arg Pro Leu Leu Ser His Tyr Leu Arg Ala His Ala	

145	150	155	160	
agc aat gac gac ggc cat cag gtc aag gtc gcc atc gtc ggc gcc ggt				528
Ser Asn Asp Asp Gly His Gln Val Lys Val Ala Ile Val Gly Ala Gly				
	165	170	175	
gcc acc ggg gtc gaa ctg gcc gca gaa ctg cgc cac gcc tcc aag gaa				576
Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu Arg His Ala Ser Lys Glu				
	180	185	190	
ctg gtc gcc tat ggg ctg gag cgc att ccg ccg gag aac ctc agc atc				624
Leu Val Ala Tyr Gly Leu Glu Arg Ile Pro Pro Glu Asn Leu Ser Ile				
	195	200	205	
acg ctg atc gaa tcc agc ccg cgt gta ctc gcc gcc ctg ccc gaa cgc				672
Thr Leu Ile Glu Ser Ser Pro Arg Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Arg				
	210	215	220	
atc agc cgc tcc gcg cac gcc acc ctg gaa agc ctg ggc gtt cgc gtg				720
Ile Ser Arg Ser Ala His Ala Thr Leu Glu Ser Leu Gly Val Arg Val				
	225	230	235	240
ctc gtc agc acc gcc gtc agc gag gtc acc gcg gaa ggc gtg aag acg				768
Leu Val Ser Thr Ala Val Ser Glu Val Thr Ala Glu Gly Val Lys Thr				
	245	250	255	
aag gac gac cag ttc atc ccc gcc gac ctc atg gtc tgg gcc gca ggc				816
Lys Asp Asp Gln Phe Ile Pro Ala Asp Leu Met Val Trp Ala Ala Gly				
	260	265	270	
gtc cgc gcg ccc gcc ttc ctc aag gag ctg gat ggt ctg gaa acc aat				864
Val Arg Ala Pro Ala Phe Leu Lys Glu Leu Asp Gly Leu Glu Thr Asn				
	275	280	285	
cgc atc aac cag ttg cag gtc cgc cag acc ctg cag act act ctg gac				912
Arg Ile Asn Gln Leu Gln Val Arg Gln Thr Leu Gln Thr Thr Leu Asp				
	290	295	300	
gac gat atc ttc gcc ttc ggc gat tgt gcc tcc tgc ccg cag ccg ggt				960
Asp Asp Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro Gln Pro Gly				
	305	310	315	320
acc gac cgc ccc gtt ccg ccg cgc gcc cag gcc gct cac cag cag gcc				1008
Thr Asp Arg Pro Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln Ala				
	325	330	335	
agc ctg ctg gcc aag tcg ctc cac cgc aag ctg cag gaa gac agc ctc				1056
Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu His Arg Lys Leu Gln Glu Asp Ser Leu				
	340	345	350	

tgc tgg agt atc gct aca gcg aac cac ggc tcg ctg atc tcc ctc tcg 1104
 Cys Trp Ser Ile Ala Thr Ala Asn His Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser
 355 360 365

agc ttc tcg gcg atc ggt aac ctg atg ggc aac ctg acc ggc aac gtg 1152
 Ser Phe Ser Ala Ile Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Asn Val
 370 375 380

acc ttg gaa ggc tgg ctg gcc cgc aag ttc tac att tcc ctg tac cgc 1200
 Thr Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Lys Phe Tyr Ile Ser Leu Tyr Arg
 385 390 395 400

atg cac cag atg gcg ctc tac ggt acc ttc cgc acc ctg atg atg atg 1248
 Met His Gln Met Ala Leu Tyr Gly Thr Phe Arg Thr Leu Met Met Met
 405 410 415

ctg ggc gac cgc ttc cgc agc agc acc gaa ccc cgc ctc aag ctt cac 1296
 Leu Gly Asp Arg Phe Arg Ser Ser Thr Glu Pro Arg Leu Lys Leu His
 420 425 430

<210> 12

<211> 432

<212> PRT

<213> Azotobacter vinelandii

<400> 12

Met Thr His Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly Gly Val Glu
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Arg Leu Gly Lys Thr Met Gly Arg Asn Phe Gln Ala Lys
 20 25 30

Ile Thr Leu Val Asp Ala Asn Met Thr His Leu Trp Lys Pro Leu Leu
 35 40 45

His Glu Val Ala Ala Gly Ser Leu Asn Ser Thr Gly Asp Glu Leu Asn
 50 55 60

Tyr Val Ala Gln Ala Lys Trp Asn Asn Phe Glu Phe Gln Tyr Gly Arg
 65 70 75 80

Met Cys Gly Leu Asp Arg Ala Asn Lys Arg Ile Arg Leu Ala Ala Gln
 85 90 95

Pro Ala Gln Glu Asp Arg Ala Pro Leu Pro Glu Arg Glu Leu Glu Tyr
 100 105 110

Asp Thr Leu Val Leu Ser Val Gly Ser Thr Thr Asn Asp Phe Gly Thr
 115 120 125

Pro Gly Ala Ala Glu Asn Cys Ile Phe Leu Glu Gly Arg Asp Gln Ala
130 135 140

Glu Arg Phe Arg Arg Pro Leu Leu Ser His Tyr Leu Arg Ala His Ala
145 150 155 160

Ser Asn Asp Asp Gly His Gln Val Lys Val Ala Ile Val Gly Ala Gly
165 170 175

Ala Thr Gly Val Glu Leu Ala Ala Glu Leu Arg His Ala Ser Lys Glu
180 185 190

Leu Val Ala Tyr Gly Leu Glu Arg Ile Pro Pro Glu Asn Leu Ser Ile
195 200 205

Thr Leu Ile Glu Ser Ser Pro Arg Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Arg
210 215 220

Ile Ser Arg Ser Ala His Ala Thr Leu Glu Ser Leu Gly Val Arg Val
225 230 235 240

Leu Val Ser Thr Ala Val Ser Glu Val Thr Ala Glu Gly Val Lys Thr
245 250 255

Lys Asp Asp Gln Phe Ile Pro Ala Asp Leu Met Val Trp Ala Ala Gly
260 265 270

Val Arg Ala Pro Ala Phe Leu Lys Glu Leu Asp Gly Leu Glu Thr Asn
275 280 285

Arg Ile Asn Gln Leu Gln Val Arg Gln Thr Leu Gln Thr Thr Leu Asp
290 295 300

Asp Asp Ile Phe Ala Phe Gly Asp Cys Ala Ser Cys Pro Gln Pro Gly
305 310 315 320

Thr Asp Arg Pro Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln Gln Ala
325 330 335

Ser Leu Leu Ala Lys Ser Leu His Arg Lys Leu Gln Glu Asp Ser Leu
340 345 350

Cys Trp Ser Ile Ala Thr Ala Asn His Gly Ser Leu Ile Ser Leu Ser
355 360 365

Ser Phe Ser Ala Ile Gly Asn Leu Met Gly Asn Leu Thr Gly Asn Val
370 375 380

Thr Leu Glu Gly Trp Leu Ala Arg Lys Phe Tyr Ile Ser Leu Tyr Arg

115	120	125	
ttc aac acg ccg ggc gtg aaa gag cac tgt atc ttc ctc gat aac ccg			432
Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu His Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro			
130	135	140	
cat cag gcg cgc cgt ttt cac cag gag atg ctg aac ctg ttc ctc aag			480
His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys			
145	150	155	160
tat tcg gct aat ctg ggc gcg aac ggt aag gtc aat atc gcc atc gtt			528
Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val			
165	170	175	
ggc ggc ggt gcg acg ggg gtt gag ctg tcg gct gaa ctg cat aat gcg			576
Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala			
180	185	190	
gta aaa cag ctg cat agc tat ggt tat aag ggg ctg acc aac gac gcg			624
Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Asp Ala			
195	200	205	
ctg aac gtg acg ttg gtt gag gct ggc gag cgt att ctg cct gcg ttg			672
Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu			
210	215	220	
ccg ccg cgt atc tcc agc gcc gcg cat aat gaa ctg acc aaa ctg ggc			720
Pro Pro Arg Ile Ser Ser Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly			
225	230	235	240
gtt cgc gtg ctg acg caa act atg gtc acc agc gcc gac gaa ggc ggt			768
Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly			
245	250	255	
ctg cat acg aaa gaa ggt gaa tat att cag gcc gat ctg atg gtg tgg			816
Leu His Thr Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Gln Ala Asp Leu Met Val Trp			
260	265	270	
gcg gcg ggt atc aaa gcg cca gat ttt atg aaa gag att ggt ggt ctg			864
Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Met Lys Glu Ile Gly Gly Leu			
275	280	285	
gaa acg aac cgc att aac caa ctg gtg gtg gaa ccg acg ctg caa acc			912
Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr			
290	295	300	
acg cgc gat cct gat att tat gcg att ggc gac tgc gct tcc tgc gca			960
Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Ala			
305	310	315	320

cgt ccg gag gga ggt ttt gtg ccg cct cgc gct cag gcg gcg cat cag 1008
 Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln
 325 330 335

atg gct acc tgc gcg atg aaa aac att ctg gcg cag atg aat ggc aaa 1056
 Met Ala Thr Cys Ala Met Lys Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys
 340 345 350

ccg ctg aaa gct tac cag tat aaa gat cat gga tcg ctg gtc tct ctg 1104
 Pro Leu Lys Ala Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu
 355 360 365

tcc aac ttc tct acc gtg ggt agt ctg atg ggg aac ctg acc cgc ggt 1152
 Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly
 370 375 380

tca atg atg att gaa gga cgt atc gcc cgc ttc gtg tat atc tcg cta 1200
 Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu
 385 390 395 400

tac cgt atg cac cag ata gcg ctg cat gga tac ttt aaa acc ggc ctg 1248
 Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu
 405 410 415

atg atg ctg gtg ggc agt att aac cgc gtc att cgt ccg cgc ctg aaa 1296
 Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys
 420 425 430

ctg cat 1302
 Leu His

<210> 14
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Salmonella typhimurium LT2

<400> 14

Met Thr Thr Pro Leu Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Met Ala Thr Gln Leu Gly His Lys Leu Gly Arg Lys Lys
 20 25 30

Lys Ala Lys Ile Thr Leu Val Asp Arg Asn His Ser His Leu Trp Lys
 35 40 45

Pro Leu Leu His Glu Val Ala Thr Gly Ser Leu Asp Glu Gly Val Asp
 50 55 60

Ala Leu Ser Tyr Leu Ala His Ala Arg Asn His Gly Phe Gln Phe Gln
65 70 75 80

Leu Gly Ser Val Met Asp Ile Asp Arg Glu Ala Lys Thr Ile Thr Ile
85 90 95

Ala Glu Leu Arg Asp Glu Lys Gly Glu Leu Leu Val Pro Glu Arg Lys
100 105 110

Ile Ala Tyr Asp Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Thr Ser Asn Asp
115 120 125

Phe Asn Thr Pro Gly Val Lys Glu His Cys Ile Phe Leu Asp Asn Pro
130 135 140

His Gln Ala Arg Arg Phe His Gln Glu Met Leu Asn Leu Phe Leu Lys
145 150 155 160

Tyr Ser Ala Asn Leu Gly Ala Asn Gly Lys Val Asn Ile Ala Ile Val
165 170 175

Gly Gly Gly Ala Thr Gly Val Glu Leu Ser Ala Glu Leu His Asn Ala
180 185 190

Val Lys Gln Leu His Ser Tyr Gly Tyr Lys Gly Leu Thr Asn Asp Ala
195 200 205

Leu Asn Val Thr Leu Val Glu Ala Gly Glu Arg Ile Leu Pro Ala Leu
210 215 220

Pro Pro Arg Ile Ser Ser Ala Ala His Asn Glu Leu Thr Lys Leu Gly
225 230 235 240

Val Arg Val Leu Thr Gln Thr Met Val Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gly
245 250 255

Leu His Thr Lys Glu Gly Glu Tyr Ile Gln Ala Asp Leu Met Val Trp
260 265 270

Ala Ala Gly Ile Lys Ala Pro Asp Phe Met Lys Glu Ile Gly Gly Leu
275 280 285

Glu Thr Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Val Glu Pro Thr Leu Gln Thr
290 295 300

Thr Arg Asp Pro Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Cys Ala Ser Cys Ala
305 310 315 320

Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Pro Pro Arg Ala Gln Ala Ala His Gln
325 330 335

Met Ala Thr Cys Ala Met Lys Asn Ile Leu Ala Gln Met Asn Gly Lys
 340 345 350

Pro Leu Lys Ala Tyr Gln Tyr Lys Asp His Gly Ser Leu Val Ser Leu
 355 360 365

Ser Asn Phe Ser Thr Val Gly Ser Leu Met Gly Asn Leu Thr Arg Gly
 370 375 380

Ser Met Met Ile Glu Gly Arg Ile Ala Arg Phe Val Tyr Ile Ser Leu
 385 390 395 400

Tyr Arg Met His Gln Ile Ala Leu His Gly Tyr Phe Lys Thr Gly Leu
 405 410 415

Met Met Leu Val Gly Ser Ile Asn Arg Val Ile Arg Pro Arg Leu Lys
 420 425 430

Leu His

<210> 15

<211> 1908

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum WCFS1

<220>

<221> CDS

<222>

<400> 15

atg gca aag aaa aat att gtc gtt gtc ggt gcg ggg ttt gct ggt gtt 48
 Met Ala Lys Lys Asn Ile Val Val Val Gly Ala Gly Phe Ala Gly Val
 1 5 10 15

tac gca acc aag aaa ctg tct aag cat ttc aaa aaa aat gca gac gtc 96
 Tyr Ala Thr Lys Lys Leu Ser Lys His Phe Lys Lys Asn Ala Asp Val
 20 25 30

gag att acg ttg att gac cgg cat tca tac ttc acg tat atg act gaa 144
 Glu Ile Thr Leu Ile Asp Arg His Ser Tyr Phe Thr Tyr Met Thr Glu
 35 40 45

tta cat gaa gtt gct acc gaa cgg gtg gaa cct gag cat atc caa tat 192
 Leu His Glu Val Ala Thr Glu Arg Val Glu Pro Glu His Ile Gln Tyr
 50 55 60

gat ttg caa cgg ttg ttc gca cgg cga aaa aac gtt cgt ctc gtg acc 240

Asp Leu Gln Arg Leu Phe Ala Arg Arg Lys Asn Val Arg Leu Val Thr	65	70	75	80	
gat acc gtg acg ggc atc gac aaa aag gca caa aca gtt act acc gaa					288
Asp Thr Val Thr Gly Ile Asp Lys Lys Ala Gln Thr Val Thr Thr Glu		85	90	95	
cac gga agt tat caa tat gat caa ctt tta att agt ttg ggt ggg gaa					336
His Gly Ser Tyr Gln Tyr Asp Gln Leu Leu Ile Ser Leu Gly Gly Glu		100	105	110	
tcc aat gac ttt ggg act ccc ggt gtt aag gaa cac ggc ttc gaa ttg					384
Ser Asn Asp Phe Gly Thr Pro Gly Val Lys Glu His Gly Phe Glu Leu		115	120	125	
tgg tcc ttc gaa caa gcg atg gca ttg cgc gct cac tta tct gca att					432
Trp Ser Phe Glu Gln Ala Met Ala Leu Arg Ala His Leu Ser Ala Ile		130	135	140	
att cgg cgg ggg gcg gcg gag ctc gac cct gct aag cgc aaa gcc atg					480
Ile Arg Arg Gly Ala Ala Glu Leu Asp Pro Ala Lys Arg Lys Ala Met		145	150	155	160
ttg acc ttt aca gtc tgt ggt tct ggt ttt act ggt tct gaa ctg att					528
Leu Thr Phe Thr Val Cys Gly Ser Gly Phe Thr Gly Ser Glu Leu Ile		165	170	175	
ggt gaa tta atc gaa tat cgt gat gtt ttg gct cga gac aac aag ctc					576
Gly Glu Leu Ile Glu Tyr Arg Asp Val Leu Ala Arg Asp Asn Lys Leu		180	185	190	
gat cca agt gaa atc acg ctc caa ttg gtc gaa gca gcg ccg act att					624
Asp Pro Ser Glu Ile Thr Leu Gln Leu Val Glu Ala Ala Pro Thr Ile		195	200	205	
att aac atg ctc aac cgg acg caa gcc ggt aag gcc gct aag tac atg					672
Ile Asn Met Leu Asn Arg Thr Gln Ala Gly Lys Ala Ala Lys Tyr Met		210	215	220	
gaa aaa cat ggt gtc aaa atc atg acg aac tcc atg att acc gaa gtc					720
Glu Lys His Gly Val Lys Ile Met Thr Asn Ser Met Ile Thr Glu Val		225	230	235	240
tgt gaa gac cat gtt aac tta aaa ggc aag gat cca att cca acc tac					768
Cys Glu Asp His Val Asn Leu Lys Gly Lys Asp Pro Ile Pro Thr Tyr		245	250	255	
acg tta atc tgg aca gcc ggt gtt cgt gct aat agt atc gtt aaa aag					816
Thr Leu Ile Trp Thr Ala Gly Val Arg Ala Asn Ser Ile Val Lys Lys		260	265	270	

ttc ggc att gaa act aac ccc cgc ggt ggt cgc ttg atg gcc aat gaa 864
 Phe Gly Ile Glu Thr Asn Pro Arg Gly Gly Arg Leu Met Ala Asn Glu
 275 280 285

ttc atg caa gct aag gat tgt aac aat atc ttc tta gcc ggt gat tca 912
 Phe Met Gln Ala Lys Asp Cys Asn Asn Ile Phe Leu Ala Gly Asp Ser
 290 295 300

acc agc tac caa gaa cct gac caa cca cgg cca gtc cca caa atc gtt 960
 Thr Ser Tyr Gln Glu Pro Asp Gln Pro Arg Pro Val Pro Gln Ile Val
 305 310 315 320

caa ggg gct gaa gaa acc gca gct aag gcc gtc gaa ggt att att aag 1008
 Gln Gly Ala Glu Glu Thr Ala Ala Lys Ala Val Glu Gly Ile Ile Lys
 325 330 335

aac gtt gac cag act gac gtt acg atc aag cca ttt aag ggc gct tat 1056
 Asn Val Asp Gln Thr Asp Val Thr Ile Lys Pro Phe Lys Gly Ala Tyr
 340 345 350

caa gca tcc gtc gac tca att ggt tcc aaa tat gcc gtt gca caa gtt 1104
 Gln Ala Ser Val Asp Ser Ile Gly Ser Lys Tyr Ala Val Ala Gln Val
 355 360 365

tta gag aag tgg aac gtc tct ggt ttt att gcc gtg ctt tta aaa cac 1152
 Leu Glu Lys Trp Asn Val Ser Gly Phe Ile Ala Val Leu Leu Lys His
 370 375 380

gcc atc aac tgg atg tac tac gtt cag att ttc tca ggt tac tac cta 1200
 Ala Ile Asn Trp Met Tyr Tyr Val Gln Ile Phe Ser Gly Tyr Tyr Leu
 385 390 395 400

ttc cag tac ttc atg cac gaa ttc ttc cgg act cgt aat aac cgt aac 1248
 Phe Gln Tyr Phe Met His Glu Phe Phe Arg Thr Arg Asn Asn Arg Asn
 405 410 415

gtc ttc cgc ggt tgg gtc tca cgg gct ggt aac gta ctc tgg agt gtg 1296
 Val Phe Arg Gly Trp Val Ser Arg Ala Gly Asn Val Leu Trp Ser Val
 420 425 430

cca ctg cgg ttc ttc tat ggt gcc atg tgg tta tgg gac tgc tgg act 1344
 Pro Leu Arg Phe Phe Tyr Gly Ala Met Trp Leu Trp Asp Cys Trp Thr
 435 440 445

aaa gtt cag gga tct gaa tcc tgg ttc act gac aag tta cgg tta cca 1392
 Lys Val Gln Gly Ser Glu Ser Trp Phe Thr Asp Lys Leu Arg Leu Pro
 450 455 460

ttc gaa tgg att acc gtg gcc gca acc agt ggt gcc tct caa gca act 1440

Phe Glu Trp Ile Thr Val Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Gln Ala Thr
465 470 475 480

aaa gcc gct gca acc agt ggt gct tct gaa gct gcc acg tca acc gtt 1488
Lys Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Glu Ala Ala Thr Ser Thr Val
485 490 495

aaa gcc gct aag ggt gtc ttc agt ctt tca tac atg tac ggt aaa gaa 1536
Lys Ala Ala Lys Gly Val Phe Ser Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Lys Glu
500 505 510

ccc ctg atg gtc ttt gac aaa atg cca cat tgg ttc gaa tca att acc 1584
Pro Leu Met Val Phe Asp Lys Met Pro His Trp Phe Glu Ser Ile Thr
515 520 525

aag gtc ttc att ccg aac atg caa atg gcc ctc ttc ttc cag aaa ttc 1632
Lys Val Phe Ile Pro Asn Met Gln Met Ala Leu Phe Phe Gln Lys Phe
530 535 540

atg act tgt gtt gaa atc gtc att gca tta tgt att ttc ttc gga ctc 1680
Met Thr Cys Val Glu Ile Val Ile Ala Leu Cys Ile Phe Phe Gly Leu
545 550 555 560

ttt act tgg ttt gct aac gca gtc acc att ggc tta gtt gtc gtc ttc 1728
Phe Thr Trp Phe Ala Asn Ala Val Thr Ile Gly Leu Val Val Val Phe
565 570 575

tgc tta tct ggc atg ttc tac tgg gtc aac att tgg atg atc ttt gtt 1776
Cys Leu Ser Gly Met Phe Tyr Trp Val Asn Ile Trp Met Ile Phe Val
580 585 590

gcc ctc gcc tta atg aac ggt tcc gga cgg aca ttt ggg tta gac tac 1824
Ala Leu Ala Leu Met Asn Gly Ser Gly Arg Thr Phe Gly Leu Asp Tyr
595 600 605

tgg gtc gtt ccg tgg atg caa aaa cac ctt gga cac tgg tgg tac ggc 1872
Trp Val Val Pro Trp Met Gln Lys His Leu Gly His Trp Trp Tyr Gly
610 615 620

aac gtt cgt tct cat tac gac ggt gtt aaa acc cgc 1908
Asn Val Arg Ser His Tyr Asp Gly Val Lys Thr Arg
625 630 635

<210> 16

<211> 636

<212> PRT

<213> Lactobacillus plantarum WCFS1

<400> 16

Met Ala Lys Lys Asn Ile Val Val Val Gly Ala Gly Phe Ala Gly Val

1	5	10	15
Tyr	Ala	Thr	Lys
	20		
Lys	Leu	Ser	Lys
		25	
His	Phe	Lys	Lys
			30
Asn	Ala	Asp	Val
Glu	Ile	Thr	Leu
	35		
Ile	Asp	Arg	His
		40	
Ser	Tyr	Phe	Thr
			45
Tyr	Met	Thr	Glu
Leu	His	Glu	Val
	50		
Ala	Thr	Glu	Arg
		55	
Val	Glu	Pro	Glu
			60
His	Ile	Gln	Tyr
Asp	Leu	Gln	Arg
	65		
Leu	Phe	Ala	Arg
	70		
Arg	Arg	Lys	Asn
			75
Val	Arg	Leu	Val
			80
Thr	Thr	Thr	Glu
Asp	Thr	Val	Thr
	85		
Gly	Ile	Asp	Lys
			90
Lys	Lys	Ala	Gln
			95
Thr	Val	Thr	Thr
His	Gly	Ser	Tyr
	100		
Gln	Tyr	Asp	Gln
			105
Leu	Leu	Ile	Ser
			110
Gly	Gly	Glu	Leu
Ser	Asn	Asp	Phe
	115		
Gly	Thr	Pro	Gly
			120
Val	Lys	Glu	His
			125
Gly	Phe	Glu	Leu
Trp	Ser	Phe	Glu
	130		
Gln	Ala	Met	Ala
		135	
Leu	Arg	Ala	His
			140
Leu	Ser	Ala	Ile
Ile	Arg	Arg	Gly
	145		
Ala	Ala	Glu	Leu
	150		
Asp	Pro	Ala	Lys
			155
Arg	Lys	Ala	Met
			160
Leu	Thr	Phe	Thr
	165		
Val	Cys	Gly	Ser
			170
Gly	Phe	Thr	Gly
			175
Ser	Glu	Leu	Ile
Gly	Glu	Leu	Ile
	180		
Glu	Tyr	Arg	Asp
			185
Val	Leu	Ala	Arg
			190
Asn	Lys	Leu	
Asp	Pro	Ser	Glu
	195		
Ile	Thr	Leu	Gln
			200
Leu	Val	Glu	Ala
			205
Ala	Ala	Pro	Thr
Ile	Asn	Met	Leu
	210		
Asn	Arg	Thr	Gln
			215
Ala	Gly	Lys	Ala
			220
Ala	Lys	Tyr	Met
Glu	Lys	His	Gly
	225		
Val	Lys	Ile	Met
			230
Thr	Asn	Ser	Met
			235
Ile	Thr	Glu	Val
			240
Cys	Glu	Asp	His
	245		
Val	Asn	Leu	Lys
			250
Gly	Lys	Asp	Pro
			255
Ile	Pro	Thr	Tyr
Thr	Leu	Ile	Trp
	260		
Thr	Ala	Gly	Val
			265
Arg	Ala	Asn	Ser
			270
Ile	Val	Lys	Lys

Phe Gly Ile Glu Thr Asn Pro Arg Gly Gly Arg Leu Met Ala Asn Glu
275 280 285

Phe Met Gln Ala Lys Asp Cys Asn Asn Ile Phe Leu Ala Gly Asp Ser
290 295 300

Thr Ser Tyr Gln Glu Pro Asp Gln Pro Arg Pro Val Pro Gln Ile Val
305 310 315 320

Gln Gly Ala Glu Glu Thr Ala Ala Lys Ala Val Glu Gly Ile Ile Lys
325 330 335

Asn Val Asp Gln Thr Asp Val Thr Ile Lys Pro Phe Lys Gly Ala Tyr
340 345 350

Gln Ala Ser Val Asp Ser Ile Gly Ser Lys Tyr Ala Val Ala Gln Val
355 360 365

Leu Glu Lys Trp Asn Val Ser Gly Phe Ile Ala Val Leu Leu Lys His
370 375 380

Ala Ile Asn Trp Met Tyr Tyr Val Gln Ile Phe Ser Gly Tyr Tyr Leu
385 390 395 400

Phe Gln Tyr Phe Met His Glu Phe Phe Arg Thr Arg Asn Asn Arg Asn
405 410 415

Val Phe Arg Gly Trp Val Ser Arg Ala Gly Asn Val Leu Trp Ser Val
420 425 430

Pro Leu Arg Phe Phe Tyr Gly Ala Met Trp Leu Trp Asp Cys Trp Thr
435 440 445

Lys Val Gln Gly Ser Glu Ser Trp Phe Thr Asp Lys Leu Arg Leu Pro
450 455 460

Phe Glu Trp Ile Thr Val Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Gln Ala Thr
465 470 475 480

Lys Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ala Ser Glu Ala Ala Thr Ser Thr Val
485 490 495

Lys Ala Ala Lys Gly Val Phe Ser Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Lys Glu
500 505 510

Pro Leu Met Val Phe Asp Lys Met Pro His Trp Phe Glu Ser Ile Thr
515 520 525

Lys Val Phe Ile Pro Asn Met Gln Met Ala Leu Phe Phe Gln Lys Phe
530 535 540

Met Thr Cys Val Glu Ile Val Ile Ala Leu Cys Ile Phe Phe Gly Leu
545 550 555 560

Phe Thr Trp Phe Ala Asn Ala Val Thr Ile Gly Leu Val Val Val Phe
565 570 575

Cys Leu Ser Gly Met Phe Tyr Trp Val Asn Ile Trp Met Ile Phe Val
580 585 590

Ala Leu Ala Leu Met Asn Gly Ser Gly Arg Thr Phe Gly Leu Asp Tyr
595 600 605

Trp Val Val Pro Trp Met Gln Lys His Leu Gly His Trp Trp Tyr Gly
610 615 620

Asn Val Arg Ser His Tyr Asp Gly Val Lys Thr Arg
625 630 635

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明の目的は、工業的に有利な L - アミノ酸の製造法を提供することにある。

【解決手段】

好気性細菌の電子伝達系においてプロトンポンプとして作用する NADH デヒドロゲナーゼ複合体のうち、電子 1 個あたり排出できるプロトン分子数がゼロである NADH デヒドロゲナーゼ複合体を構成する NADH デヒドロゲナーゼをコードする DNA を導入して得られる微生物を培地に培養し、培養物中に L - アミノ酸を生成、蓄積させ、該培養物より L - アミノ酸を採取することを特徴とする L - アミノ酸の製造法を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 5 3 3 6 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1 . 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名 協和醗酵工業株式会社